



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**METODY STANOVENÍ OBSAHU  
POLYHYDROXYALKANOÁTŮ V BAKTERIÁLNÍCH  
BUŇKÁCH**

ANALYTICAL METHODS FOR DETERMINATION OF POLYHYDROXYALCANOATES CONTENT IN  
BACTERIAL CELLS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Diana Černayová

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

**BRNO 2018**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1194/2017  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Diana Černayová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název bakalářské práce:

Metody stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátů v bakteriálních buňkách

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Zpracovat aktuální literární rešerši na zadané téma.
- 2) Na základě literární rešerše navrhnout soubor dostupných experimentálních technik pro stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátů v bakteriálních buňkách.
- 3) Na vhodném modelovém mikroorganismu experimentálně otestovat a vyhodnotit využitelnost navržených metod.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Diana Černayová  
student(ka)

-----  
Ing. Petr Sedláček, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## Abstrakt

Táto bakalárska práca sa zaoberá metódami na stanovenie polyhydroxyalkanoátov (PHA) v bunkách baktérie *Cupriavidus necator* H16. Medzi použité metódy patrí infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR), Ramanova spektroskopia, turbidimetria a termické analýzy (termogravimetrická analýza a diferenčná skenovacia kalorimetria). Výsledky z metód boli porovnávané s obsahom PHA stanoveného plynovou chromatografiou. Pri infračervenej spektroskopii s Fourierovou transformáciou a Ramanovej spektroskopii sa zistila pozitívna korelácia pomeru charakteristických pásov k obsahu PHA. S použitím FTIR bolo možné okrem kvantitatívneho stanovenia PHA zistiť aj kvalitu vzorky (kryštalickosť /amorfnosť). Ďalej sa použila turbidimetrická analýza, pri ktorej sa sledovala závislosť rozptylu UV-VIS žiarenia na obsahu PHA v bakteriálnych bunkách. Najefektívnejšou technikou sa ukázala byť termogravimetrická analýza. Závislosť úbytku hmotnosti v oblasti spaľovania PHA, na jeho obsahu (zisteného plynovou chromatografiou) bola stanovená s najvyššou koreláciou k plynovej chromatografii. Metóda DSC sa neukázala byť vhodnou alternatívnou náhradou na stanovenie obsahu PHA, ale umožnila stanoviť či sa polymér nachádza v stave kryštalickom, alebo amorfnom.

## Abstract

This bachelor thesis deals with methods that are used for determination of polyhydroxyalkanoates (PHA) in cells of bacteria *Cupriavidus necator* H16. To the applied methods belong Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, turbidimetry and thermal analysis (thermogravimetric analysis and differential scanning calorimetry). The results of each method were compared to amount of PHA determined by gas chromatography. Fourier transform infrared spectroscopy and Raman spectroscopy revealed a linear relation between ratio of characteristic peaks and amount of PHA. FTIR enabled to determine not only the quantitative amount of PHA, but the quality of the sample (crystallinity, amorphous state) as well. Another method was turbidimetry, which has shown correlation between dispersion of UV-VIS light to amount of PHA in bacterial cells. Thermogravimetric analysis was the most effective technique for determination of PHA. The dependence of weight loss of PHA on its content (found by gas chromatography) was determined with the highest accuracy to gas chromatography. The last method- DSC was not alternative replacement for quantitative PHA determination. However, DSC indicated crystalline and amorphous state of the polymer.

## **Klíčové slová**

Polyhydroxyalkanoáty, PHA, polyhydroxybutyrát, *Cupriavidus necator* H16, FTIR , Ramanova spektroskopie, turbidimetrie, termická analýza

## **Keywords**

Polyhydroxyalkanoates, PHA, polyhydroxybutyrate, *Cupriavidus necator* H16, FTIR, Raman spectroscopy, turbidimetry, thermal analysis

ČERNAYOVÁ, D. *Metody stanovení obsahu polyhydroxyalkanoátů v bakteriálních buňkách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 55 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

## Prehlásenie

Prehlasujem, že tom bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
Diana Černayová

### *Pod'akovanie:*

*Predovšetkým by som sa chcela poďakovať môjmu vedúcemu bakalárskej práce Ing. Petrovi Sedláčkovi, PhD. za odborné vedenie práce, ochotu a cenné rady pri spracovaní tejto bakalárskej práce. Ďakujem tiež Ing. Eve Slaninovej za pomoc v laboratóriu, za možnosť konzultácií a že si vždy na mňa našla čas a ochotne mi poradila. Vďaka patrí aj mojej konzultantke Ing. Anete Chytilovej.*

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ .....	9
2.1	Polyhydroxyalkanoáty .....	9
2.1.1	Fyzikálne a chemické vlastnosti .....	9
2.1.2	Syntéza PHA .....	10
2.1.3	Biodegradácia .....	12
2.1.4	Polyhydroxybutyrát .....	12
2.1.5	Využitie PHA .....	13
2.2	Vybrané modelové mikroorganizmy .....	14
2.2.1	<i>Cupriavidus necator</i> H16 .....	14
2.3	Navrhnuté metódy stanovenia PHA .....	15
2.3.1	Plynová chromatografia .....	15
2.3.2	Termická analýza .....	15
2.3.3	Optické metódy .....	16
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	19
3.1	Použité chemikálie, prístroje a baktérie .....	19
3.1.1	Použité baktérie .....	19
3.1.2	Chemikálie na kultiváciu: .....	19
3.1.3	Použité prístroje: .....	19
3.2	Kultivácia baktérií .....	20
3.2.1	Príprava inokula .....	20
3.2.2	Príprava produkčných médií .....	20
3.2.3	Nepriame stanovenie počtu buniek .....	21
3.2.4	Príprava sušenej biomasy .....	22
3.3	Použité metódy .....	22
3.3.1	Plynová chromatografia .....	22
3.3.2	Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou .....	23
3.3.3	Ramanova spektroskopia .....	23
3.3.4	Turbidimetria .....	23
3.3.5	Termická analýza .....	24
4	VÝSLEDKY A DISKUSIE .....	25
4.1	Kultivácia buniek v rôznych kultivačných médiách .....	25
4.2	Stanovenie obsahu PHA zrovnávajúcou metódou- plynovou chromatografiou .....	26
4.3	Techniky vibračnej spektroskopie .....	28
4.3.1	Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou .....	28

4.3.2	Ramanova spektrofotometria.....	34
4.4	Turbidimetria.....	36
4.5	Termické analýzy .....	39
4.5.1	Diferenčná skenovacia kalorimetria.....	39
4.5.2	Termogravimetrická analýza .....	41
4.5.3	Izotermické sušenie .....	43
5	ZÁVER.....	45
6	ZOZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNYCH ZDROJOV .....	47
7	ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV .....	51
7.1	Zoznam skratiek .....	51
7.2	Zoznam symbolov .....	51
8	ZOZNAM PRÍLOH .....	53

# 1 ÚVOD

Plasty sú v súčasnej dobe veľmi využívaným materiálom. Vďaka ich dobrým fyzikálnym a chemickým vlastnostiam, ako je napr. pevnosť a tvarovateľnosť majú v technickom priemysle obrovské využitie. Plasty slúžia ako náhrada za materiály (papier, sklo, drevo a pod.) a vyrábajú sa z nich obaly a materiály na každodenné použitie (fľašky, kefký). Nanešťastie, kvôli ich obrovskému využitiu a spomínaným vlastnostiam predstavujú problém v životnom prostredí. Nie je možné ich mikrobiologicky degradovať a tak sa hromadia v ekosystéme [1,2].

Alternatívnym riešením je hľadanie rozložiteľných plastov, ako sú polyhydroxyalkanoáty. Tieto takzvané „bioplasty“ sú vďaka svojim fyzikálnym a chemickým vlastnostiam (pevnosť, teplota topenia, biokompatibilita) čoraz využívanéjšie v technologickom priemysle, kde môžu nahrádzať plasty ako je polypropylén, alebo poly-mliečna kyselina. Oproti syntetickým plastom (polyetylén, polypropylén) majú polyhydroxyalkanoáty schopnosť biodegradácie (biologického rozkladu). V prostredí sa rozkladajú vo vhodných podmienkach (predovšetkým pomocou mikroorganizmov) na jednoduchšie látky (oxid uhličitý a vodu). Proces rozkladu trvá niekoľko týždňov až mesiacov, čo je v porovnaní so spomínanými plastami obrovský rozdiel (rozklad syntetických môže trvať aj vyše sto rokov) [3].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú tvorené v bakteriálnych bunkách za účelom uchovania uhlíku a energie. Produkujú ich rozličné baktérie (napr. *Cupriavidus Necator*, *Pseudomonas*) a uchovávajú PHA v cytoplazme vo forme intracelulárnych granúl [1].

Produkcia PHA sa v bakteriálnych bunkách líši v závislosti od podmienok prostredia. Pri dostatočnom množstve cukru, ale rozdielnych množstvách dusíku a stopových prvkov, baktérie syntetizujú rozdielne zásoby PHA. Techniky na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie obsahu PHA sú preto podstatné v oblasti výskumu a neskôr aj výroby plastov z mikrobiálnych zdrojov. Súčasná metóda býva časovo náročná (plynová chromatografia), z toho dôvodu sa hľadajú efektívne a rýchle techniky stanovenia, na ktoré je zameraná aj táto bakalárska práca.

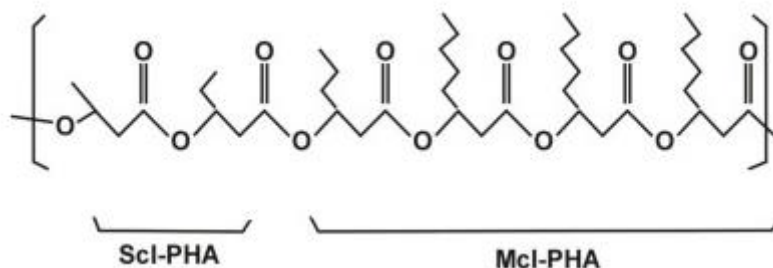


## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú lineárne polyestery hydroxykyselín, produkované a akumulované celou radou rôznych baktérií vo forme intracelulárnych granúl. Baktérie (*Cupriavidus Necator* H16, *Pseudomonas*), ich produkujú ako zásobnú formu energie a uhlíka a tiež im pomáhajú prežiť pri stresových podmienkach- ako je napríklad nedostatok biogénnych prvkov ako dusík, fosfor. Obsah polyhydroxyalkanoátov v bunkách baktérií môže dosiahnuť až 90 % ich hmotnosti [1].

PHA je možné rozdeliť podľa počtu uhlíkových atómov v monomérnej jednotke (Obrázok 1) a to do dvoch skupín: scl (*short-chain-length*) a mcl (*medium-chain-length*). Prvá skupina pozostáva v rámci monoméru z 3-5 uhlíkov, zatiaľ čo v druhom prípade sú PHA tvorené 6 - 14 atómami uhlíka [2].



Obrázok 1 Štruktúrny vzorec scl-PHA a mcl-PHA [3]

#### 2.1.1 Fyzikálne a chemické vlastnosti

Vlastnosti izolovaných polyhydroxyalkanoátov závisia predovšetkým od dĺžky reťazca monomérov a ich mólovej hmotnosti. PHA majú semikryštalický charakter a môžu dosahovať kryštalickosť až 70 %, čo je porovnateľné so syntetickým polypropylénom, ale na rozdiel od neho majú nižšiu ťažnosť (predĺženie pri pretrhnutí) [4].

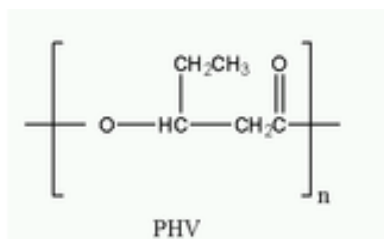
Ako už bolo spomínané, dôležitým parametrom je ich molekulová hmotnosť. Podľa štúdie *Špitalského a spol.* sa so zmenou molekulovej hmotnosti z 100 000 g.mol<sup>-1</sup> na 300 000 g.mol<sup>-1</sup> zmenila pevnosť materiálu z 10 na 30 MPa [5]. Tiež sú polyhydroxyalkanoáty málo deformovateľné a ťažko prepúšťajú vodu [4]. PHA polyméry sú termoplastické (teplota topenia sa pohybuje až ku 180°C) a v závislosti od ich zloženia sa menia viskoelastické vlastnosti. PHA sú UV stabilné na rozdiel od iných bipolymérov (ako je napr. polymliečna kyselina), vysoko hydrofóbne (rozpuštné v halogenidových roztokoch ako chloroform, dichlormethan, či dichlorethan). Dôležitou vlastnosťou PHA je ich biokompatibilita- sú dobre znášané v ľudskom tele a postupom času sa vstrebávajú [6].

Polyhydroxyalkanoáty vplyvom okolitých podmienok ako je teplota, alebo pH, časom krehnú a strácajú tak svoju pevnosť. Podľa *Kroninga a Lemstru* to vysvetľuje teória sekundárnej kryštalizácie a fyzikálne starnutie. Fyzikálne starnutie hovorí o relaxačnom procese amorfných polymérov. Možné

sú iba malé konformačné zmeny, ale napriek tomu, ak dôjde k rýchlemu ochladnutiu materiálu z taveniny do skleného stavu, amorfne reťazce nedosiahnu rovnovážny voľný objem. V prípade, že sa materiál skladuje pri teplotách okolo svojho bodu tuhnutia, pomalým reorganizovaním reťazcov, jeho voľný objem klesá. Pri semikryštalických polyméroch dochádza k ovplyvňovaniu interlamelárneho amorfného materiálu. Kryštály tam slúžia ako uzly sieťujúce reťazce polyméru v trojdimenzionálnej sieti. To spôsobuje, že fyzikálne starnutie sa pozoruje aj pri vyšších teplotách ako je teplota tuhnutia [7].

Ďalšou teóriou je teória sekundárnej kryštalizácie. Keďže počas spracovania polyméru nedochádza k ukončeniu kryštalizácie medzi cyklami spracovania, následne prebieha pomalá postupná kryštalizácia. Tá končí až po jednom mesiaci skladovania. Podľa *Koniga a Lemstri* tento čas súhlasí s konečnými zmenami ich fyzikálnych vlastností [7].

Odolnosť voči okolitým podmienkam, ako aj pevnosť a teplota topenia sa pri PHA zlepšujú pridaním prímiesí, ako je napríklad valerát (*Obrázok 2* nižšie). Kombinovať sa môže až 150 rôznych monomérov. Mechanické vlastnosti (pevnosť, termoplasticita) sa dajú zmeniť zmiešaním alebo modifikovaním povrchu, či kombinovaním PHA s inými polymermi, enzýmami a anorganickými materiálmi, čo sa môže prejavovať v širokých škálach aplikácií (napr. výroba fliaš, obalov, v medicíne) [6].



*Obrázok 2 Štruktúrny vzorec polyhydroxyvalerátu [8]*

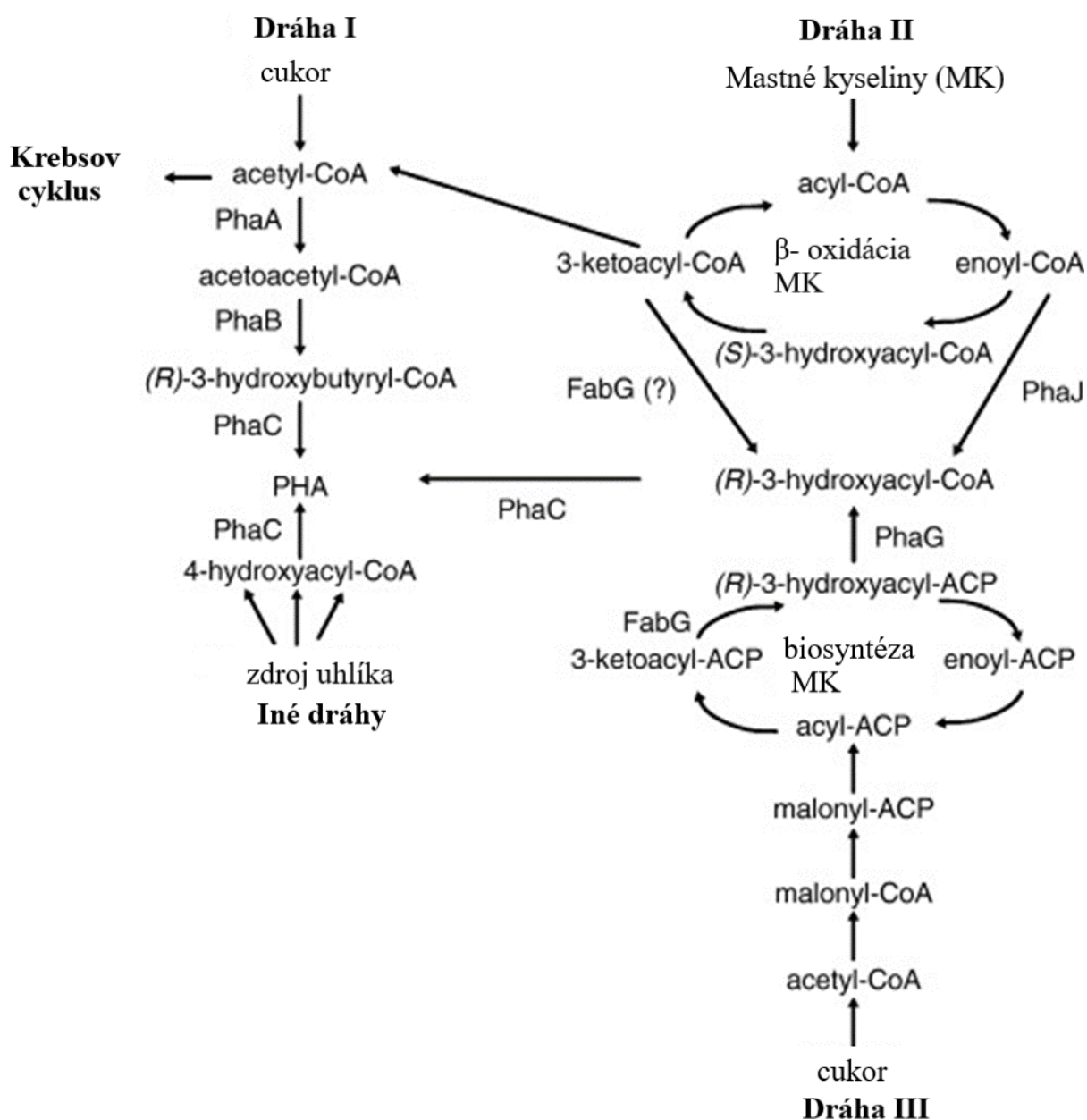
### 2.1.2 Syntéza PHA

Ako už bolo zmienené v predchádzajúcej kapitole (2.1), polyhydroxyalkanoáty sa nachádzajú vo forme granúl v cytoplazme vnútri bakteriálnych buniek. K syntéze PHA dochádza obvykle pri nadbytku uhlíkového zdroja a pri nedostatku dôležitých prvkov ako dusík, fosfor, horčík, alebo síra (napr. bakérie *A. eutrophus*, *Protomonas exorquens*). Množstvo produkovaného PHA závisí okrem okolitých podmienok (živiny, teplota, PH) aj na druhu mikroorganizmu [9].

Metabolické dráhy syntézy PHA sú rozdelené do troch skupín. Skupiny sa líšia enzýmami, ktoré katalyzujú vznik PHA. Prvá dráha (viď *Obrázok 3*) je najznámejšia a využíva ju aj *C. necator*. Zdrojom uhlíka je v tomto prípade cukor. Monoméry 3-hydroxybutyrátu (3HB) vznikajú kondenzáciou dvoch acetyl-CoA molekúl (z Krebsovho cyklu z acetoacetyl-CoA). Enzým Acetoacetyl CoA-reduktáza redukuje acetoacetyl-CoA na 3-hydroxybutyryl-CoA. Na koniec enzým PHA syntáza katalyzuje polymerizáciu cez esterifikáciu. Z 3-hydroxybutyryl-CoA na poly(3-hydroxybutyrát) [10].

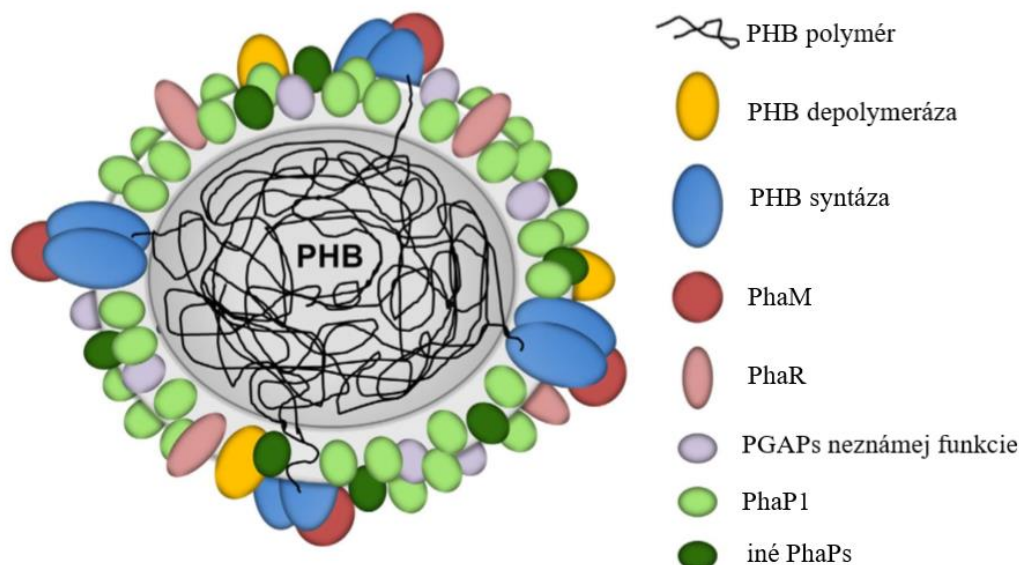
Druhá syntetická dráha tvorí substrát (3-hydroxydecanoyl-CoA)  $\beta$ - oxidáciou mastných kyselín. Katalýza tejto reakcie prebieha za prítomnosti enzýmu transacylázy. Zo substrátu vzniká polymerizáciou PHA. To je napríklad u baktérií rodu *Pseudomonas* [10].

Tretia dráha pomáha vytvárať monoméry PHA z uhlíkového zdroja, ktorým je cukor (fruktóza, glukóza). Z (R)-3-hydroxyacylu, intermediátu z  $\beta$ -oxidácie mastných kyselín pomocou transacylácie vzniká CoA [9].



Obrázok 3 Dráhy syntetizujúce PHA [11]

V závislosti na kultivačných podmienkach, môžu byť PHA nasyntetizované ako homo (zložené z rovnakých esterových monomérov) tak kopolyestery (tvorené kombináciou dikarboxylových kyselín a diolov) rôznymi mastnými hydroxyalkanovými kyselinami. Podstatnými sú v tomto procese enzýmy, zvané PHA syntázy. Dve triedy PHA syntáz rozlišujú, či sa naviaže mastná kyselina s krátkym, alebo stredne dlhým reťazcom [12]. Tieto enzýmy sa nachádzajú na povrchu granule spolu s bielkovinami [12]. Granulu obsahujúcu PHA je možné vidieť na obrázku (Obrázok 4).



Obrázok 4 Štruktúra granule obsahujúcej PHB. Povrchovú vrstvu tvoria proteíny (označené farebne), ktoré sú na obrázku zväčšené k jadrú z dôvodu lepšej viditeľnosti.[13]

### 2.1.3 Biodegradácia

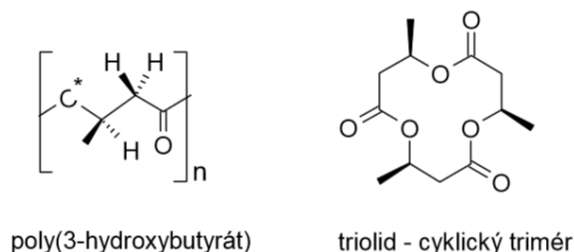
V úvodnej kapitole (2.1) bolo spomínané, že medzi výhody PHA patrí aj ich biodegradácia- biologický rozklad. Baktérie sú schopné okrem syntézy, polyhydroxyalkanoáty súčasne aj intracelulárne degradovať v závislosti od podmienok (závisí napr. od prítomnosti živín). Degradácia prebieha pôsobením intracelulárnych depolymeráz za vzniku uhlíka a energie [2].

Okrem prvého prípadu sa degradácia môže uskutočňovať aj extracelulárne v okolitom prostredí, predovšetkým pomocou depolymerizačných enzýmov produkovaných mikroorganizmami (napr. *Alcaligenes faecalis*). Enzým PHB depolymeráza hydrolyzuje polymérové reťazce na jednoduchšie oligoméry a monoméry [14, 15]. Medzi ovplyvňujúce faktory patria mikrobiologické parametre daného ekosystému, ako mikrobiálna diverzita, hustota populácie [2]. Dôležité sú aj fyzikálno-chemické faktory, kam patrí napríklad prostredie, pH, teplota a kryštalickosť polyméru [14].

### 2.1.4 Polyhydroxybutyrát

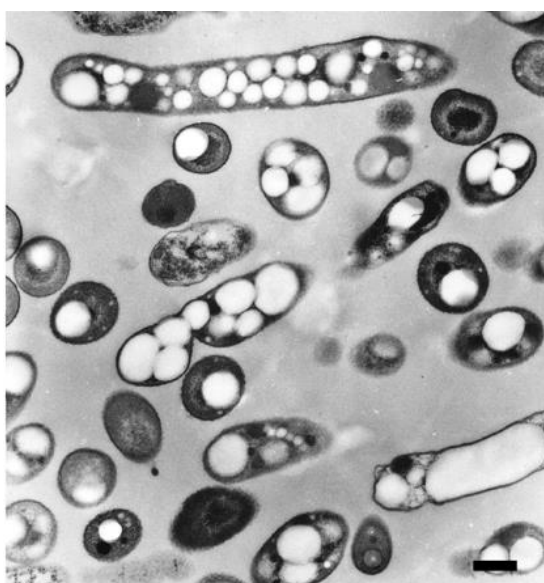
Táto bakalárska práca sa týka stanovenia predovšetkým polyhydroxybutyrátu (PHB). Jedná sa o polymér v skupine mcl- polyhydroxyalkanoátov, ktorý sa vyskytuje ako homopolymér, alebo ako hydroxybutyrátové reziduá. Homopolymér slúži ako zásoba energie pre mikroorganizmy. Hydroxybutyrátové reziduá s nižšou mólovou hmotnosť (cyklické oligolidy a ich deriváty) môžu tvoriť komplexy s inými biomolekulami (napr. kalcium polyfosfát). Derivát slúži ako neurónový prenášač a komplexy majú schopnosť prenášať ióny [16, 17].

Na obrázku (Obrázok 5) je vidieť štruktúru monomérnej jednotky PHB a cyklický oligolid.



Obrázok 5 Štruktúra monomérskej jednotky PHB (vľavo) a cyklického triméru [17]

Vysokomolekulový polyhydroxybutyrát je polyester s opticky aktívnymi jednotkami v (R) konfigurácii, čo ho tiež činí semikryštalickým. PHB tvorí tenké laminárne kryštály, ktoré sú zoskupené do doštičkovitých tvarov, alebo sférulitov [17].



Obrázok 6 *Cupriavidus necator* H16 pod mikroskopom- vo vnútri možno vidieť svetlé granule PHA [18]

### 2.1.5 Využitie PHA

Vďaka spomínaným vlastnostiam PHA (v kapitole 2.1.1)- ako je pevnosť, bioaktivita a biokompatibilita, majú polyhydroxyalkanoáty veľa možností využitia, ako je využitie v medicíne. Nízka kyslosť predstavuje malé riziko v porovnaní s inými biopolymérmi ako kyselina poly-mliečna (PLA), alebo polyglykolová (PGA). PHA sa využívajú ako samovstrebateľné nite, scaffoldy alebo implantáty. Pri PHA scaffoldoch sa využívajú viaceré rozličných prísady ako anorganické materiály, alebo iné typy polymérov [24, 25]. Využitie majú aj pri regenerácii kostného tkaniva, kde poskytujú mechanickú oporu, zatiaľ čo vyvolávajú rast buniek. Tiež sa vo farmakológii môžu uplatniť ako nosiče liečiv [26].

PHA nie sú však využívané iba v oblasti medicíny. Používajú sa k náhrade plastov na výrobu potravinových fólií, fliaš, alebo vreciek. Toto využitie by mohlo riešiť otázku problémov týkajúcich sa environmentálneho znečistenia. Nevýhodou je vysoká cena PHA, ktorá sa pohybuje v rozmedzí

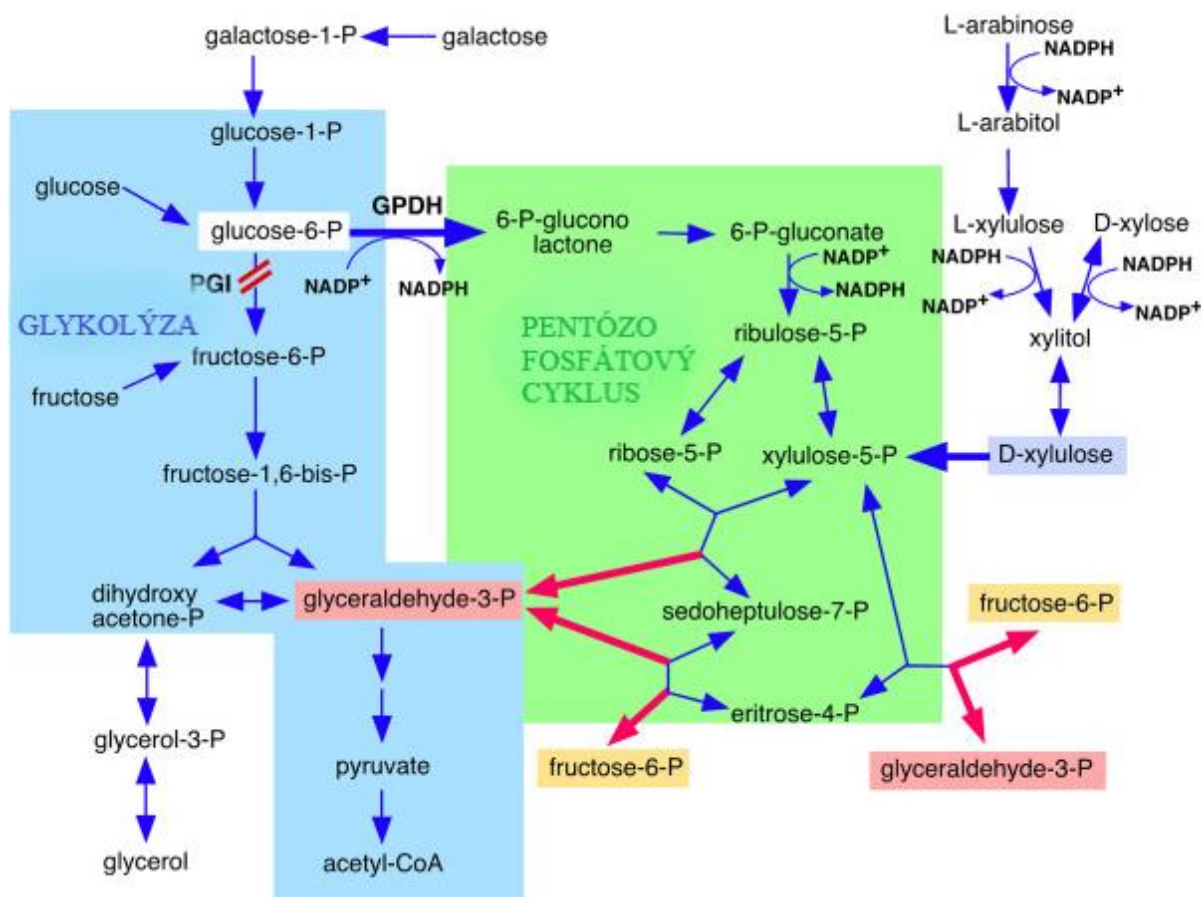


7 - 10 Euro/kg, čo je obrovský rozdiel v porovnaní s ostatnými polymérmi- napríklad polypropylén, ktorého cena je 1,30 Euro/kg, alebo polyetylénu 1 Euro/kg [26, 27].

## 2.2 Vybrané modelové mikroorganizmy

### 2.2.1 *Cupriavidus necator* H16

Jednou z najznámejších baktérií, tvoriacich PHA je práve *Cupriavidus necator* H16 (viď Obrázok 6). *C. necator* H16 je gramnegatívna baktéria, ktorej bunková stena je tvorená z liposacharidov a zvonku prekrytou druhou membránou [19]. Zdrojom energie je oxidovaný vodík s kyslíkom- ako akceptorom elektrónu. Nachádza sa v prostredí bez prístupu kyslíka (anaerobnom), alebo v prostredí s prístupom kyslíka (aerobnom). *Cupriavidus necator* H16 je vysoko adaptabilná, využíva heterotrofický aj autotrofický spôsob výživy [20]. V prípade autotrofného spôsobu výživy na seba viaže uhlík z pentózo-fosfátového cyklu (Obrázok 7) [21]. Pri nadbytku uhlíka získaného z cukru tvorí PHA, konkrétne polyhydroxybutyrát. Obsah PHA môže byť až 90 % jej celkovej hmotnosti [22].



Obrázok 7 Prepojenie pentózo-fosfátového cyklu a glykolýzy pri autotrofnom spôsobe výživy bakérie *Cupriavidus necator* H16 [23]

## 2.3 Navrhnuté metódy stanovenia PHA

### 2.3.1 Plynová chromatografia

Najvyužívanejšou metódou na stanovenie polyhydroxyalkanoátov je plynová chromatografia (GC). Je to metóda, ktorá je založená na interakcií analytu s mobilnou a stacionárnou fázou. Mobilnou fázou v prípade plynovej chromatografie je plyn [28].

Nevýhodou pri stanovovaní PHA metódou GC je komplikovaná príprava vzorky. Keďže polyhydroxyalkanoáty sú polyméry, analýza touto technikou na prístroji nie je možná (polymérnu molekulu nie je možné dať do plynného stavu). Z toho dôvodu je potrebná úprava vzorky na monoméry, pri ktorej je potrebných niekoľko činidiel ako je chloroform a kyselina sírová v alkohole- najčastejšie methanole [28].

Napriek zdĺhavej príprave sa jedná o najpresnejšiu metódu, ktorá zisťuje presný obsah PHA v bunkách baktérií [28].

### 2.3.2 Termická analýza

Jednou z najdôležitejších fyzikálne-chemických techník je termická analýza, ktorá slúži k analyzovaniu širokého spektra materiálu, či už syntetického, alebo biologického. Princípom termogravimetrickej analýzy je sledovanie meranej veličiny (napr. tepelný tok medzi vzorkou a referenciou, hmotnosť vzorky) v priebehu definovaného teplotného programu (zahrievanie, chladenie, alebo konštantná teplota). Zo zmeny meranej veličiny sa získa informácia o fázových prechodoch, alebo termodegradačných procesoch a pod [29, 30].

#### *Termogravimetria*

Pri metóde termogravimetrickej analýzy (TGA) počas merania dochádza k zvyšovaniu teploty, čo má za následok postupný úbytok hmotnosti stanovovanej látky, keďže dochádza k jej tepelnej degradácii [29].

TGA metóda sa aplikuje aj na biologické vzorky. Napríklad sa využila k termogravimetrickej analýze PHA z baktérie *Bacillus subtilis*. Teplota bola zvyšovaná z 0 - 800 °C s krokom 50 °C/min. K analýze došlo v inertnej atmosfére s dusíkom. Vzorka bola stabilná až po 236,52 °C. Ku zmene hmotnosti došlo v rozmedzí teplôt 236,52 - 276,19 °C, kvôli odpareniu molekúl vody. Hmotnosť ďalej klesala medzi 276,19 °C až po 362,41 °C a ďalej z 362,41 - 656,14 °C. Rozdiely spôsobené termickou degradáciou sú pripisované zosieťovaniu, ktoré je brané ako prvý krok v rozklade polyméru [29].

#### *Diferenciálna skenovacia kalorimetria*

Diferenciálna skenovacia kalorimetria (DSC) je metóda, pri ktorej dochádza k skúmaniu tepelných vlastností materiálu. Využíva sa pri určení teplôt topenia, sklených prechodov a kryštalizácií rôznych materiálov. Konkrétne aplikácie sa týkajú analýzy polymérov, emulzií, alebo kinetiky reakcií [31].

Meranie spočíva v konštantnej rýchlosti ohrevu (chladenia) dvoch nádob, z ktorých je jedná prázdna, zatiaľ čo druhá obsahuje vzorku. Tým pádom sa pri konštantnom zvyšovaní teploty líši tepelný tok do jednotlivých nádob- z dôvodu zloženia vzorky a prebiehajúcich fázových zmien vo vzorke. Meria sa rozdiel v tepelných tokoch do jednotlivých nádob [31].

Dôležitým údajom pri tejto metóde je tepelná kapacita, ktorá vyjadruje množstvo tepla, ktoré je potrebné pri zvýšení teploty o 1 K. Tepelná kapacita môže byť vyjadrená aj pomocou tepelného toku a rýchlosti ohrevu [31]. Ďalšou podstatnou veličinou je entalpia, ktorá vyjadruje tepelnú energiu v jednotkovom množstve látky. Jedná sa o termodynamickú veličinu súvisiacu s vnútornou energiou, tlakom a objemom sústavy [32].

Sklený prechod je spojený so zmenou vnútornej štruktúry materiálu. To sa prejaví hlavne na mechanických vlastnostiach- pod teplotou skleného prechodu je materiál krehký a tvrdý. Nad teplotou skleného prechodu sa materiál stáva pružným. Nedochádza však iba k zmenám mechanických vlastností materiálu, ale aj tepelnej kapacity [31].

Anjali a spol. v jednej štúdií vyskúšali DSC metódu na stanovenie PHA. Vzorka s hmotnosťou menej ako 10 mg bola zahrievaná od 20 °C do 200 °C s krokom 10 °C/min. Výsledkom boli dva píky. Prvý pík bol endotermický (s maximom pri 114,87 °C) bol spôsobený odparením vody. Druhý pík- exotermický bol pozorovaný medzi teplotami 175 a 350 °C. V blízkosti teploty 167,92 °C mohlo dôjsť najskôr k re-kryštalizácii, po ktorej nasledovala degradácia polyméru [29].

### **2.3.3 Optické metódy**

Optické metódy využívajú javov spojených so vznikom elektromagnetického žiarenia (ohyb, odraz, rozptyl), alebo javy spojené s interakciou žiarenia s analyzovanou látkou (absorpcia, emisia). Na základe interakcie s danou látkou je optické metódy možné rozdeliť na spektrálne (UV-VIS spektrofotometria, infračervená spektroskopia, Ramanova sprektoskopia) a nespektrálne (turbidimetria, nefelometria) [33].

#### ***Infračervená spektroskopia***

Bežné techniky na stanovenie extrahovateľných PHA v bunkách, ako plynová chromatografia, alebo fluorescenčná mikroskopia, sú namáhavé, pracné a môžu poškodiť vzorku. Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR) je nepriama analytická metóda na štúdium molekulových štruktúr a tiež bola navrhnutá ako vhodný kandidát na zistenie a stanovenie PHA v neporušených bunkách [34].

Princípom metódy je absorpcia infračerveného žiarenia pri prechode vzorkou. Počas toho dochádza k zmenám rotačných a vibračných energetických stavov molekuly v závislosti na zmenách dipólového momentu molekuly. Výstup je infračervené spektrum, kde je zobrazená závislosť absorbancie (poprípade transmitancie) na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia. Pomocou veľkého množstva knižníc je možné identifikovať neznámu analyzovanú látku [34].



ATR metóda, alebo tiež zoslabený úplný odraz, je vhodná pre stanovenie vzoriek, ktoré silne absorbujú infračervené žiarenie. Touto technikou nastane zoslabenie totálneho odrazu založená na princípe násobného úplného odrazu žiarenia na fázovom rozhraní meranej vzorky a meracieho kryštálu, ktorý má vysoký index lomu. Najčastejšie sú využívané kryštály ako germánium, selenid zinočnatý, kremík, alebo diamant [35].

Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou bola v roku 2016 *Porrasom* a kol. použitá na rýchle stanovenie PHA v zmiešanej, ale aj čistej forme bakteriálnych kultúr. Na výsledky z FTIR sa aplikovali tri rozličné metódy: regresná analýza, metóda čiastočne najmenších štvorcov (PLS) a nelineárna spektroskopia. Výsledky boli vynesené oproti PHA hodnotám meraných s technikou plynovej chromatografie. PHA sa v týchto kultúrach pohybovalo z najnižšej koncentrácie na priemernú (0 - 44 % vysušenej biomasy). Avšak na analýzu kombinovanej zmesi a čistej kultúry s koncentráciou PHA pohybujúcou sa z najnižšej koncentrácie po vysokú (0 - 93 % vysušeného obsahu biomasy) bola metóda PLS najefektívnejšia [34].

Spomínaná štúdia porovnáva tri rozličné metódy analýzy FTIR dát na kvantifikovanie PHA v biomase. Výsledky boli spracované novým prístupom a následne porovnané s existujúcimi lineárnymi metódami. Autori väčšiny publikácií kvantifikujú PHA v priemernom rozsahu v čistej kultúre. *Porras* a spol. pripravili zmiešané aj čisté kultúry obsahujúce širší rozsah PHA v kalibračnej krivke. Výsledný model je užitočný na rýchle kvantifikovanie širšieho rozsahu obsahu v biomase [34].

### ***Ramanova spektroskopia***

Ramanova metóda je metódou, ktorá skúma molekulové štruktúry a interakcie vo funkčných skupinách a poskytuje dodatočné informácie k infračervenej spektroskopii [1].

Princípom je využitie Ramonovho javu- dopadajúce svetlo sa pri interakcii s vibračnými a rotačnými stavmi atómov/molekúl rozptýli, kedy má rozptýlené žiarenie inú vlnovú dĺžku ako dopadajúce [1].

*Samek, Obruča* a spol. sa zaoberali analýzou PHA produkovaných baktériou *Cupriavidus necator* H16 bola zostavená kalibrácia obsahu tohto polyesteru. Bunky obsahovali PHB od 12 % do 90 %. PHB odpovedal príslušný pík pri vlnovej dĺžke  $1736\text{ cm}^{-1}$ . Ako dva štandardy boli použité píky odpovedajúce amidu s vlnovou dĺžkou  $1662\text{ cm}^{-1}$  a DNA s  $786\text{ cm}^{-1}$ . Výsledky podielu intenzity píku odpovedajúce PHB a intenzity vnútorného štandardu boli vynesené v grafe v závislosti na množstve PHB zisteného plynovou chromatografiou. Získala sa kalibračná závislosť. Táto štúdia ukázala využitie Ramanovej spektroskopie pri stanovení obsahu PHA v bunkách *Cupriavidus necator* H16. Technika je oveľa efektívnejšia a rýchlejšia ako plynová chromatografia, keďže nie je nutná zdlhavá úprava vzorky pred stanovením [36].

### ***UV-VIS spektrofotometria***

UV-VIS spektroskopia, alebo spektroskopia ultrafialového viditeľného žiarenia je metóda, pri ktorej sa meria absorbancia v UV oblasti [37]. Absorbancia charakterizuje mieru absorpcie elektromagnetického

žiarenia v látke a určuje sa z Lambert-Beerovho zákona. Je závislá od hrúbky steny kyvety  $l$ , molárneho absorpčného koeficientu  $\varepsilon$  a koncentrácie vzorky  $c$  [38].

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (1)$$

Elektróny absorbujú energiu vo forme ultrafialového, alebo viditeľného žiarenia, nastane excitácia na neväzbové elektrónové orbitály. Čím je elektrón ľahšie excitovateľný, tým vyššiu vlnovú dĺžku môže absorbovať [37].

UV-VIS spektroskopia sa využíva ako detekcia spojená často s inou technikou. Najčastejšie je ňou vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC). V tomto prípade sa stanovuje kyselina krotónová, ktorá pochádza z PHB. Po hydrolýze biomasy s koncentrovanou  $H_2SO_4$  sa 3HB prevádza na kyselinu krotónovú, čo sa stanovuje pomocou HPLC s použitím UV detektora pri  $\lambda=210$  nm [28].

Baktérie akumulujúce PHA sú odolnejšie voči stresovým podmienkam ako baktérie, ktoré PHA neobsahujú. Rovnako majú vyššiu odolnosť pri UV žiarení. To je práve kvôli tomu, že PHA granule sa špecificky viažu k jadru a tvoria okolo neho niečo ako ochranu, čím chránia DNA [39].

### ***Turbidimetria a nefelometria***

Turbidimetria a nefelometria patria medzi nespektrálne optické metódy- to znamená, že sa pri nej nesleduje výmena energie medzi látkou, ale zmeny vlastností žiarenia (v tomto prípade sa jedná o rozptyl). Metódy sa využívajú pri koloidných a disperzných roztokoch [33].

V prípade nefelometrie sa meria intenzita svetla rozptýleného pod určitým uhlom, avšak v prípade turbidimetrie sa meria intenzita svetla prechádzajúceho vzorkou v pôvodnom smere. Množstvo rozptýleného svetla závisí na koncentrácii častíc, ich veľkosti (množstvo rozptýleného svetla je nepriamoúmerné molekulovej hmotnosti častíc) a na vlnovej dĺžke svetla (pri kratšej vlnovej dĺžke je rozptýlený väčší podiel svetla) [33].

Turbidimetriu použili na stanovenia PHA už v roku 1958 *Williamson a Wilkinson*vy. Jednalo sa o citlivú a časovo nenáročnú metódu. Pri metóde sa sledovalo zakalenie roztoku chlórnanu sodného ( $NaClO$ ), ktoré je spôsobené príčinou nerozpustených PHA granúl. Presnosť tejto metódy závisí na veľkosti a tvare granúl a na homogenite suspenzie [40].

### **3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ**

#### **3.1 Použité chemikálie, prístroje a baktérie**

##### **3.1.1 Použité baktérie**

V experimentálnej časti boli použité bakteriálne kultúry rodu *Cupriavidus Necator* H16 CCM 3726, získanej zo zbierky Masarykovej Univerzity v Brne.

##### **3.1.2 Chemikálie na kultiváciu:**

Nutrient Broth (HIMEDIA)

Peptone (HIMEDIA)

Agar powder (HIMEDIA)

Síran amonný p.a.,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  (Lach-ner, ČR)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného p.a.,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (Lach-ner, ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lach-ner, ČR)

Síran hořečnatý p.a.,  $\text{MgSO}_4$  (Lach-ner, ČR)

D-fruktóza p.a.,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  (Lach-ner, ČR)

Destilovaná voda

Chlorid draselný KCl

Chlorid sodný NaCl

##### **3.1.3 Použité prístroje:**

Analytické váhy, Boeco

Centrifuga, Boeco

Mikrocentrifúga Centrifuge 5417R

Termostat, LS-35

Laminárny box Aura mini, Bio Air Instruments

Temperovaná trepačka, Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments

Vortex Heidolph Reax Top

Plynový chromatograf, Thermo Scientific

- Trace FC Ultra FID detektor, Fannigan (USA)
- Kolóna- DB-WAX 30 m by 0,25 mm na stanovenie P(3HB)

UV-VIS spektrofotometer, Hitachi U-3900H

Termogravimetrický analyzátor Q5000, TA Instruments

FT-IR spektrometer Nicolet iS50, Thermo Fisher Scientific Inc.

- jednodrazový diamantový nadstavec iS50 ATR, iS50 Raman Modul

Diferenčný skenovací kalorimeter DSC Q2000, TA Instruments

## 3.2 Kultivácia baktérií

### 3.2.1 Príprava inokula

Inokula na kultiváciu boli pripravované v Erlenmeyerových bankách o objeme 250 ml. Obsahovali 25 g/l pevného média Nutrient Broth. Pripravilo sa celkovo 100 ml inokula, ktoré sa rozdelilo do dvoch Erlenmeyerových baniek o objeme 100 ml. Po hodinovej sterilizácii sa médiá ochladili na izbovú teplotu a došlo 3krát k zaočkovaniu každého média z agarovej platne pomocou bakteriologickej kľučky. Očkovanie prebiehalo v sterilnom boxe. Po zaočkovaní sa inokulum vložilo na temperovanú trepačku nastavenú na 30 °C a rýchlosť trepania na 170 rpm na 24 hodín.

Inokulum bolo použité k očkovaniu produkčných médií, do ktorých sa pridávalo 5 % inokula z celkového objemu.

### 3.2.2 Príprava produkčných médií

Pripravených bolo 7 typov produkčných médií, ktoré sa líšili v prídavku cukru, síranu amónneho ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), či prídavku peptonu. Všetky médiá slúžili na kultiváciu jedného typu baktérie-*Cupriavidus Necator* H16.

#### Médium č.1: NB

Nutrient Broth                      25 g  
Destilovaná voda                    1000 ml

#### Ostatné médiá:

Tabuľka 1 Produkčné médiá líšiace sa v množstve fruktózy, síranu amonného a peptonu

číslo	Produkčné médium	Fruktóza [g/l]	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [g/l]	Pepton [g/l]
2.	10/3	10	3	-
3.	20/3/5	20	3	5
4.	20/5	20	5	-
5.	20/1	20	1	-
6.	20/3	20	3	-
7.	5/3	5	3	-

Ku všetkým produkčným médiám- okrem média č.1, boli pridané soli v množstve, ktoré je možné vidieť v tabuľke (Tabuľka 2):

Tabuľka 2 Množstvá soli navážené do médií 2,3,4,5,6,7

Názov	m [g/l]
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,020
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	11,100
$\text{MgSO}_4$	0,063

Množstvá sú rozrátané na 1 l destilovanej vody.

Zloženie roztoku biogénnych prvkov (ďalej ako MESCO) je zobrazené nižšie (Tabuľka 3):

Tabuľka 3 Zloženie roztoku stopových prvkov MESCO

Názov	m [g/l]
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	9,700
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	7,800
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	0,156
$\text{CoCl}_3 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,119
$\text{NiCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,118

Navážené množstvá z tabuľky boli premiešané v 1 l destilovanej vody.

Z každého produkčného média bolo pripravených 2krát po 200 ml. Do každej Erlenmeyerovej banky bolo pridaných 1 ml roztoku MESCO a 5 ml inokula vo vopred vysterilizovanom boxe. Kultivácia prebiehala na temperovanej trepačke 72 hod pri 30 °C a 170 rpm.

### 3.2.3 Nepriame stanovenie počtu buniek

K stanoveniu počtu buniek sa použila metóda CFU (*colony forming unit*). Na začiatok sa pripravili agarové plotne- do 3 Erlenmeyerových baniek, o objeme 300 ml, sa navážilo 25 g/l Nutrient Broth a 18 g/l agaru. Po premiešaní sa všetky tri Erlenmeyerove banky nechali 1 hodinu sterilizovať. Po sterilizácii došlo k rozliatiu agaru do petriho miesiek a počkalo sa, kým agar stuhol. Zo siedmych produkčných médií sa odobralo po 0,1 ml do eppendorfiiek a následne sa doplnili 0,9 ml vopred vysterilizovaným fyziologickým roztokom PBS, ktorého zloženie je možné vidieť v tabuľke (Tabuľka 4)

Tabuľka 4 Zloženie fyziologického roztoku PBS

Názov	[g/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	2,90
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	92,00
KCl	8,00
NaCl	0,24

Všetky soli boli premiešané v 1 l destilovanej vody.

Z takto pripravených 10 % roztokov sa pipetou odobralo 0,1 ml a opäť došlo k zriedeniu fyziologickým roztokom. Týmto postupom sa pokračovalo až na koncentráciu  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ . Z dvoch posledných koncentrácií sa odoberalo po 0,1 ml na agarové plotne. Po nanesení sa médium rozotrela sterilnou hokejkou. Petriho miska sa uzavrela a nechala sa v termostate 72 hod pri 30 °C. Z každej koncentrácie pri každom produkčnom médiu sa spravili tri Petriho misky.

Metóda vychádza z predpokladu, že z jednej životaschopnej bunky vzniká jedna kolónia, preto sa po 72 hodinách kultivácie, kolónie vyrastené na agarových plotniach spočítali. Ďalej sa pracovalo s tými koncentraciami, kde sa počet buniek nachádzal v rozmedzí 20 - 200.

### 3.2.4 Príprava sušenej biomasy

K príprave sušenej biomasy sa použilo 10 ml produkčného média, ktoré sa pipetou odobralo do plastových skúmaviek. Následne sa obsah plastových skúmaviek dal odstrediť pri 5000 rpm na 5 min. Po odstredení sa zliat supernatant, pridalo sa 5 ml destilovanej vody, ktorá sa spolu s usadenou biomasou premiešala na vortexe. Po premiešaní a pridaní ďalších 5 ml destilovanej vody sa zmes nechala opäť odstrediť pri rovnakých podmienkach. Po odstredení sa supernatant zliat a vzorky boli umiestnené do termostatu pri teplote 70 °C.

## 3.3 Použité metódy

### 3.3.1 Plynová chromatografia

Koncentrácia PHA v sušine zo všetkých produkčných médií bola stanovená plynovou chromatografiou s FID detekciou.

Príprava spočívala v rozpustení pripravenej sušiny (z 3.2.4) v 1 ml chloroformu, následnom pridaní 0,8 ml 15 % kyseliny sírovej v methanole (15 % roztok). Po esterifikácii pri 95 °C po dobu 3 hod, je k vzorkám pridaných 0,5 ml hydroxidu sodného (0,05 M). Po následnom pretrepaní dôjde k odobratiu

50  $\mu\text{l}$  spodnej fázy a opätovnom pridaní 950  $\mu\text{l}$  chloroformu. Analýza prebieha na GC spojenou s hmotnostnou spektrometriou. Výsledky sú potom porovnané so štandardom.

### **3.3.1.1 Stanovenie kalibračnej priamky**

Kalibračná priamka bola zostavená pomocou štandardu P(3HB) (biomer), v koncentráciách 4;7;10;14  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  napipetované do vialiek a doplnené chloroformom na 1 ml. K roztokom bolo pridaných 0,8 ml kyseliny sírovej v methanole (15 % roztok) a uzavreté vialky sa vložili na esterifikáciu do termostatu pri 95 °C po dobu troch hodín. Po vybratí z termostatu sa pridalo 0,5 ml hydroxidu sodného na hydrolýzu. Po oddelení dvoch fáz sa odobralo 50  $\mu\text{l}$  spodnej fázy a ku každej vzorke sa pridalo 950  $\mu\text{l}$  chloroformu. Vzorky sa analyzovali plynovou chromatografiou s FID detekciou.

### **3.3.2 Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou**

Metódou FTIR boli merané dva typy vzoriek. Prvé vzorky odobrané zo sušiny (pripravenej postupom 3.2.4). Druhý typ vzoriek bol odobraný z produkčného média sušený priamo na ATR kryštáli aby sa zabránilo kryštalizácii.

Oba typy vzoriek nebolo treba upravovať, pretože vzorky boli zmerané na infračervenej spektroskopii metódou ATR na diamantovom kryštály v spektrálnom rozsahu od 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ . Bolo stanovených priemerom 64 skenov s rozlíšením približne 2  $\text{cm}^{-1}$ . Vzorka získaná z jedného kultivačného média bola zmeraná trikrát.

### **3.3.3 Ramanova spektroskopia**

Rovnako ako v predchádzajúcom prípade boli merané vzorky odobraté zo sušenej biomasy (pripravenej v 3.2.4). Bez akýchkoľvek úprav bola každá vzorka meraná na Ramanovom spektrometri v spektrálnom rozsahu 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ , s rozlíšením približne 4  $\text{cm}^{-1}$  v počte 1024 skenov.

### **3.3.4 Turbidimetria**

Na meranie rozptylu bolo odobratých 100 ml roztoku z každého produkčného média. Postupným riedením pôvodného roztoku destilovanou vodou, sa získalo 16 rôznych koncentrácií. Riedenie zásobnej disperzie bolo v rozsahu 0 $\times$  - 100 $\times$ . Od 0 $\times$  - 50 $\times$  bolo riedenie nasledovné: 5 $\times$ ;10 $\times$ ;15 $\times$ ;20 $\times$ ;25 $\times$ ;30 $\times$ ;35 $\times$ ;40 $\times$ ;45 $\times$ ;50 $\times$ . V rozmedzí 50 $\times$  - 100 $\times$  sa zásobná disperzia riedila: 60 $\times$ ;70 $\times$ ;80 $\times$ ;90 $\times$ ;100 $\times$ . UV-VIS spektrometrom bola zmeraná absorbanca zriedených roztokov v rozsahu 800 - 200  $\text{nm}^{-1}$  s krokom 0,5  $\text{nm}^{-1}$ .

### 3.3.5 Termická analýza

#### *Termogravimetrická analýza*

Na termogravimetrickú analýzu (TGA) sa odobrali vzorky zo sušiny (viď 3.2.4), ktoré boli nanesené v malom množstve na platinovú panvičku. Panvička bola umiestnená do TGA prístroja, kde dochádzalo k postupnému zvyšovaniu teploty s krokom 10 °C/min, na teplotu 900 °C v oxidačnej atmosfére (vzduch) za súčasného merania hmotnosti. Meranie trvalo približne 90 min. Aj v tomto prípade bolo každé médium merané tri razy.

Ďalej boli metódou TGA realizované experimenty na izotermické sušenie. Vzorky boli odobraté zo zamrazených bunkových disperzií. Po čiastočnom rozmrazení sa odpipetovali 4 ml vzorky do dvoch 2 ml eppendorfiiek a nechali sa odstrediť pri 5000 rpm po dobu 5 min. Po odstredení sa zliat supernatant a odstredená biomasa sa naniesla na platinovú panvičku. Pripravené vzorky boli merané pri teplote 70 °C po dobu 40 min. Po tejto dobe bola teplota zvyšovaná krokom 10 °C/min až na teplotu 200 °C. Konečná hmotnosť bola potrebná k stanoveniu celkového obsahu vody vo vzorke.

#### *Diferenčná skenovacia kalorimetria*

Pred meraním diferenciálnou skenovacou kalorimetriou (DSC) bolo potrebné rozmraziť zamrazené bunkové disperzie a pripraviť vzorky rovnakým postupom ako pri izotermickom sušení (Termogravimetrická analýza viď 3.3.5).. Po odstredení sa zliat supernatant a na analytickej váhe sa navážilo na platinovú panvičku vhodnú na DSC metódu približne 8 - 10 mg vzorky. Na jednu hodinu sa nechala navážená vzorka sušiť v sušiarňi pri teplote 27 °C, aby sa zbavila nadbytočnej vody. Po hodine sa zvažila hmotnosť, ktorá sa pohybovala okolo 6 mg, vysušená panvička bola následne hermeticky uzavretá a vložená do prístroja. Meranie prebiehalo v rozmedzí teplôt od – 50 °C po 190 °C , s krokom 10 °C/min v troch meracích cykloch kedy dochádzalo striedavo k zahrievaniu, chladeniu a opätovnému zahrievaniu vzorky. Doba merania bola približne 60 min a každé médium bolo zmerané tri krát.



## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIE

Práca je zameraná na vytipovanie metód vhodných pre identifikáciu baktérií produkujúcich PHA a ich otestovanie z hľadiska využiteľnosti pre kvantitatívne stanovenie obsahu PHA v bunkách. V rámci práce boli použité metódy chromatografické, spektroskopické a termické. Metódy boli navzájom porovnávané podľa nárokov na prípravu vzorky, časovej náročnosti, opakovateľnosti a ďalších aspektov, ktoré obecné ovplyvňujú výber optimálnej analytickej metódy.

### 4.1 Kultivácia buniek v rôznych kultivačných médiách

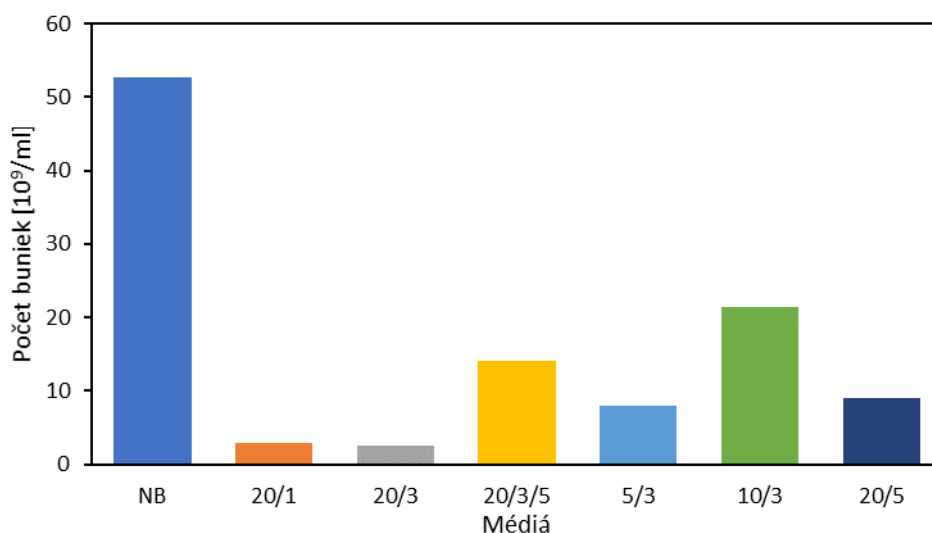
Bakteriálne bunky boli pripravené v rôznych kultivačných médiách, ktoré sa líšili prídavkom cukru a soli (síranu amónneho). Rozdielne podmienky spôsobili, že sa baktérie líšili nielen v raste, ale aj v produkcii PHA granúl.

Na úvod bolo potrebné stanoviť koncentráciu buniek po ich kultivácii v jednotlivých kultivačných médiách za účelom ďalšieho spracovania pri jednej z metód (turbidimetrie), ale tiež z dôvodu obecného overenia súvislosti medzi rastom baktérií a ich produktivitou, čo do obsahu PHA. Pri stanovení počtu buniek sa použila nepriama metóda CFU (postup je opísaný v kapitole 3.2.3). Počet buniek v jednotlivých produkčných médiách možno vidieť v grafe nižšie (Obrázok 8), alebo v tabuľke (Tabuľka 5).

Pomocou CFU sa zistil počet buniek pri koncentráciách  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ . Využila sa koncentrácia, kde bol počet buniek v rozmedzí 20 - 200. Zo zisteného priemeru sa vypočítalo množstvo buniek podľa rovnice:

$$x = MO \cdot z \cdot X \quad (2)$$

Kde  $MO$  je priemerný počet kolónií (z troch Petriho misiek),  $z$  je použité zriedenie ( $10^7$ , pri médiu NB  $10^8$ ) a  $X$  je prepočet na 1 ml (podľa pipetovaného objemu).



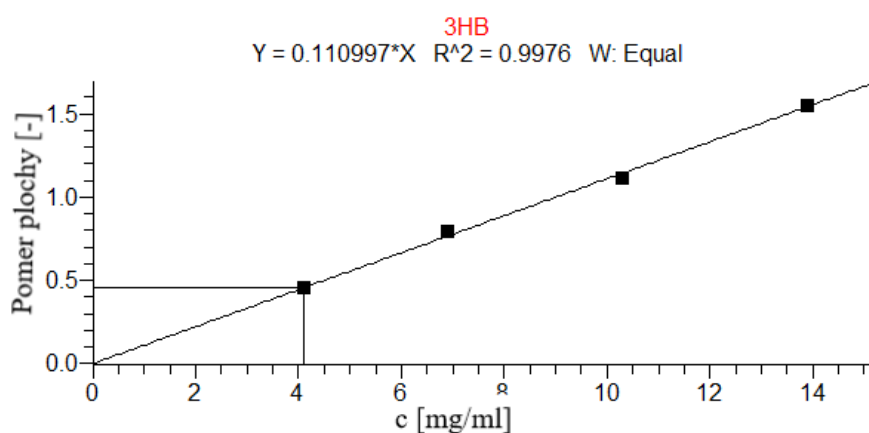
Obrázok 8 Počet buniek v jednotlivých produkčných médiách

## 4.2 Stanovenie obsahu PHA zrovnávajúcou metódou- plynovou chromatografiou

Obsah PHA v produkčných médiách bol stanovený plynovou chromatografiou. Jedná sa o najspoľahlivejšiu a štandardne používanú metódu na stanovenie obsahu PHA. Na druhú stranu, hlavnou nevýhodou je, že pred samotným analyzovaním je nutná časovo náročná úprava vzorky, opísaná v kapitole 3.3.1, keďže sa jedná o polymér.

Zo štandardu PHB bola riedením roztoku v rôznych pomeroch a následnou analýzou plynovou chromatografiou s FID detekciou zostrojená kalibračná priamka.

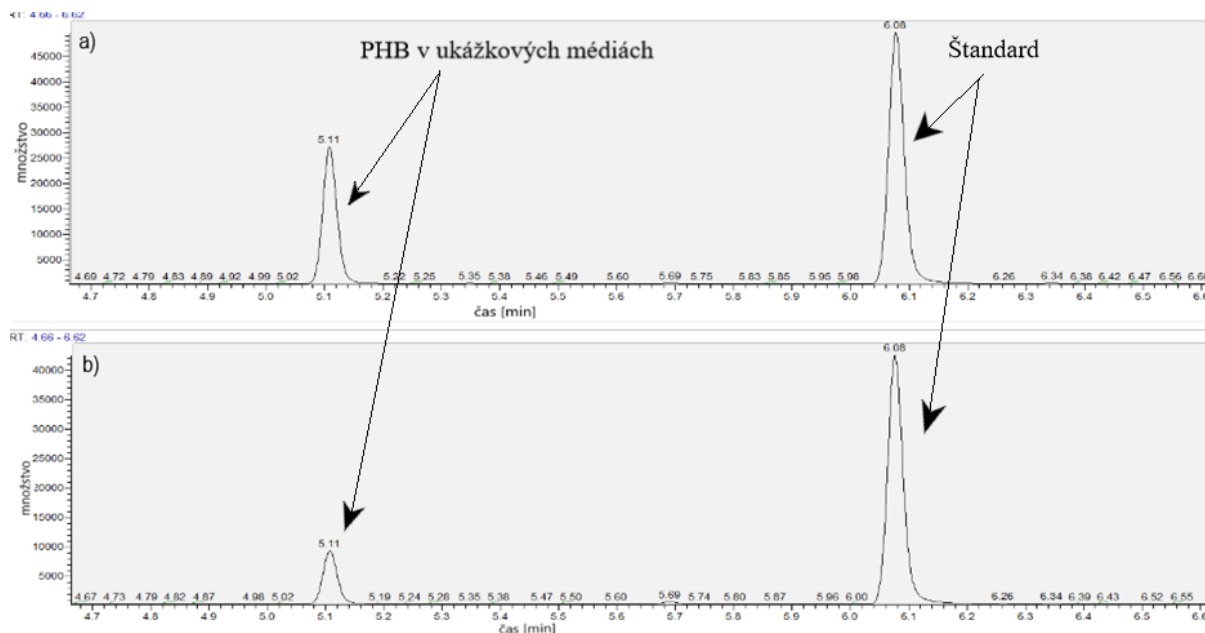
Zo závislosti plochy pík na koncentrácií PHB bola zostrojená regresná rovnica (viď *Obrázok 9*). Z výslednej rovnice boli vypočítané koncentrácie PHB v analyzovaných produkčných médiách.



Obrázok 9 Kalibračná krivka štandardu P(3HB) analyzovaná plynovou chromatografiou

Chromatogram štandardu polyhydroxybutyrátu sa nachádza v prílohe (*Obrázok 29*).

Na chromatogramoch (*Obrázok 10*) je možné vidieť: a) chromatogram média 20/3 (obsahuje 70,85 % PHB), b) chromatogram média 5/3 (obsah PHB je 30,3 %). Prvý pás charakterizuje PHB, zatiaľ čo druhý slúži ako štandard. Pri médiu 20/3 je prvý pás výraznejší ako je to v prípade média 5/3, kvôli vyššiemu obsahu PHB. Pri stanovení neznámeho množstva PHB vo vzorke je pomer plochy píku PHB a vnútorného štandardu dosadený do rovnice, získanej z kalibračnej priamky (*Obrázok 9*). Výsledok po vynásobení číslom 100 vyjadruje množstvo PHB v percentách.



Obrázok 10 Chromatogram médií a) 20/3, b) 5/3

Baktérie v rôznych produkčných médiách, sa príčinou rozdielnych množstiev cukru a soli (pripravené v časti 3.2.2) líšili v zastúpení obsahu PHA. Koncentrácia sa pohybovala v rozmedzí od 1,6 - 88% (prehľad je vidieť v *Tabuľka 5*). Najnižší obsah malo podľa očakávaní médium NB, v ktorom baktérie neboli vystavené stresovým podmienkam (nedostatok dusíka a stopových prvkov). V podmienkach s dostatočným množstvom cukru rástla produkcia PHB granúl, ako je možné vidieť na ostatných médiách. V prípade média 20/5 a média 20/3/5, ktoré obsahovalo aj pepton, bol obsah PHB rovnaký. Najviac percentuálneho zastúpenia obsahovalo médium 20/1 s nízkym obsahom dusíka.

Kultivačné podmienky mali okrem produkcie PHB vplyv aj na rast buniek. Pri ideálnych podmienkach (médium NB) si baktérie nemuseli tvoriť zásoby vo forme PHB granúl. Namiesto toho, využili energiu k rastu a deleniu buniek, čoho dôkazom je počet buniek v médiu NB (*Obrázok 8*). V prípade médií 20/3 a 20/1 sú baktérie stresovým podmienkam vystavené- obsahujú nízky obsah dusíka. To má za následok spomalenie rastu a tvorbu PHB. Presný počet buniek sa nachádza v *tabuľke (Tabuľka 5)*.

Tabuľka 5 Obsah PHB v produkčných médiách

médium	CFU [ $10^9$ /ml]	PHB [%]	odchylka [%]
NB	52,7	1,6	0,2
10/3	2,9	44	1,8
20/3/5	2,5	65,4	0,9
20/5	14,0	65	1,9
20/1	8,1	88	3,6
20/3	21,5	71	2,9
5/3	8,0	30,3	0,5

Zastúpenie PHB v bakteriálnych bunkách sa pohybovalo v širokom rozsahu (1,6 - 88%), obsahujúcim 7 bodov, z ktorých dve médiá mali približne rovnaký obsah PHB (20/3/5;20/5).

Výsledky ukazujú, že plynová chromatografia stanovuje PHA s vysokou presnosťou. Jedná sa o spoľahlivú a veľmi citlivú metódu umožňujúcu ich kvantifikovanie. Nevýhodou je v tomto prípade vysoká časová náročnosť úpravy vzorky zahrňujúca esterifikáciu a použitie nebezpečných karcinogénnych látok, ako je chloroform. Taktiež následná analýza rovnakej vzorky inou analytickou technikou nie je možná, pretože GC je deštruktívna metóda. Z týchto dôvodov sa hľadajú efektívne, rýchle a nenáročné techniky, ktoré by boli stanovovali obsah PHA v bakteriálnych bunkách. V tejto práci sú výsledky z iných metód vynášané na výsledkoch z GC za účelom porovnávania metód a to zistením miery lineárnej závislosti (korelácie) medzi charakteristickým parametrom, stanoveným danou metódou a skutočným obsahom PHB stanoveným GC.

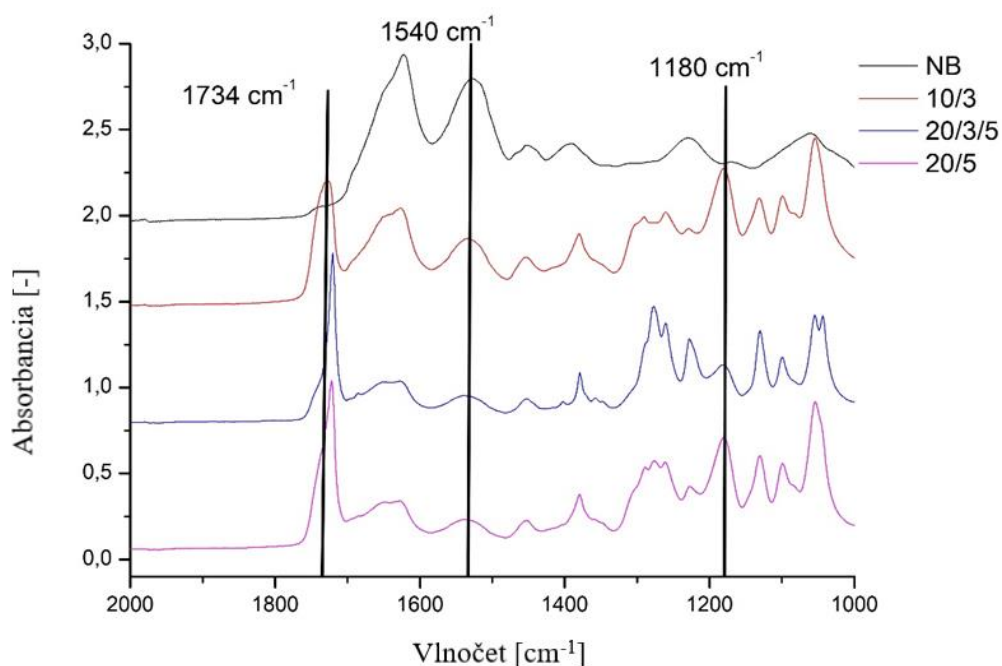
### 4.3 Techniky vibračnej spektroskopie

Vibračné techniky označujú metódy, ktorých princípom je študovanie zmeny rotačných a vibračných energetických stavov molekuly. Do tejto skupiny je možné zaradiť dve metódy použité pri meraní vzoriek- Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou, a Ramanova spektroskopia.

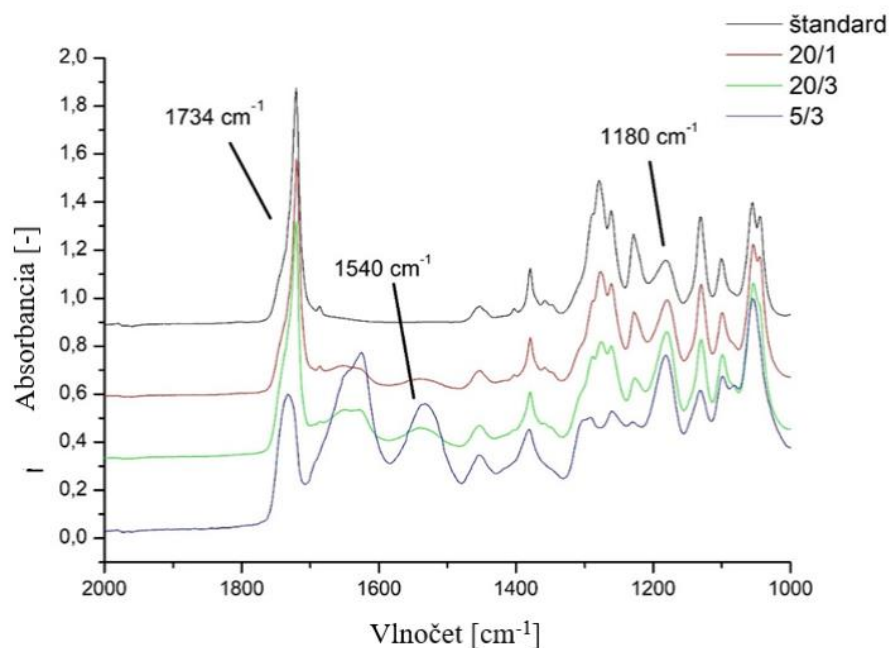
#### 4.3.1 Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou

Infračervená spektroskopia je metóda, analyzujúca rotačné a vibračné stavy molekúl. Vibračné spektrá vzoriek biomasy získanej z pripravených produkčných médií (viď kapitolu 3.2.2) boli zaznamenávané FT-IR spektrometrom Nicoletis50 v spektrálnom rozsahu  $400-4000\text{ cm}^{-1}$  s krokom  $2\text{ cm}^{-1}$ . Výsledné spektrá vznikli priemerom z 64 skenov. Meranie prebehlo metódou ATR na jednodrazovom diamantovom kryštály, takže vzorku nebolo treba pred samotným meraním nijak upravovať (viď kapitolu 3.3.2).

Okrem produkčných médií prebehla analýza aj štandardu PHB. Spektrá produkčných médií boli ku spektru štandardu porovnávané za účelom zistenia dôležitých pásov, ktoré slúžili k ďalšiemu spracovaniu. Vyznačené pásy charakterizovali emisiu žiarenia pri konkrétnej vlnovej dĺžke určitej molekuly. Na nasledujúcich obrázkoch (*Obrázok 11*, *Obrázok 12*) je možné vidieť časť spektier ( $2000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ ) všetkých produkčných médií spolu s vyznačenými pásmi. Vyznačené pásy pre lepšiu prehľadnosť boli pásy normalizované a posúvané po osi y (označujúcej absorbanciu). Celé spektrá v rozsahu  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  sa nachádzajú v prílohe (*Obrázok 30*, *Obrázok 31*)

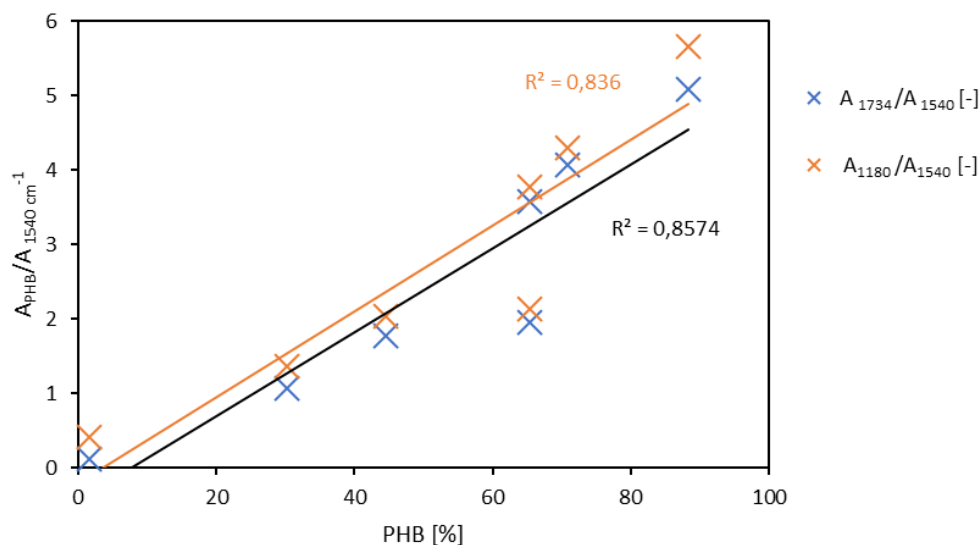


*Obrázok 11 FTIR spektrá médií NB, 10/3;20/3/5;20/5 v závislosti normalizovanej absorbancie na vlnočte*



Obrázok 12 FTIR spektrá médií 20/1;20/3;5/3 a štandardu PHB v závislosti absorpcie na vlnóčte

Z analyzovaného štandardu sa zistili konkrétne pásy na spracovanie. Intenzita emisného žiarenia pre PHB je charakteristická pri pásoch 1734 a 1180  $\text{cm}^{-1}$ . Intenzita absorpcie je pri tejto metóde závislá na pokrytí kryštálu vzorkou, preto bolo nutné stanoviť pomer charakteristických pásov pred ďalším vyhodnotením. Stanovený pomer bol medzi pásom PHB (1734 a 1180  $\text{cm}^{-1}$ ) k pásu 1540  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý charakterizoval intenzitu amidov v zbytkovej biomase (obsiahnutých v bielkovinách) - PHB v tejto oblasti neabsorbuje. Výsledky normalizácie boli vynesené na percentuálnom zastúpení PHB, ako je možné vidieť na nasledujúcom grafe (Obrázok 13).



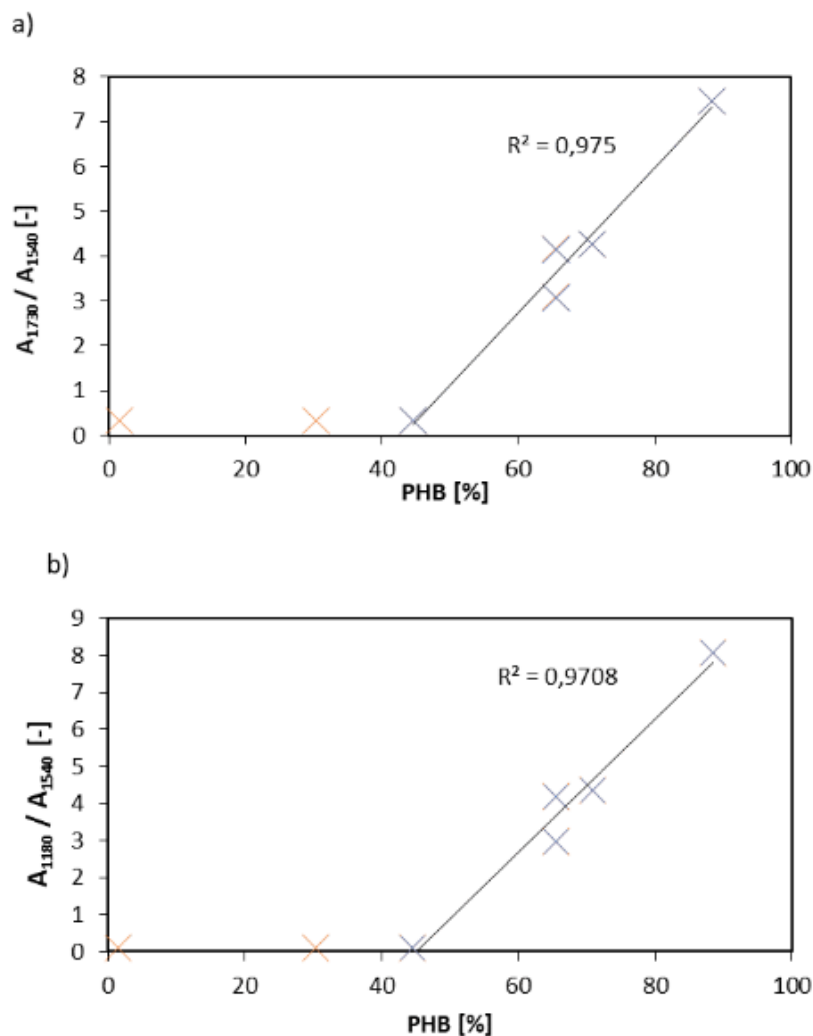
Obrázok 13 Pomer absorbancií charakt. pásov pri (1734 a 1180  $\text{cm}^{-1}$ ) k pásu interného štandardu (1540  $\text{cm}^{-1}$ ) vynesená na obsahu PHB

Z grafu (*Obrázok 13*) je vidieť dve lineárne závislosti. Prvá (modré body) označuje pomer absorbancií pásu pri  $1734\text{ cm}^{-1}$  k pásu  $1540\text{ cm}^{-1}$ . Druhá (oranžová) udáva pomer absorbancií pásov pri  $1180\text{ cm}^{-1}$  k rovnakému pásu ako v prvom prípade. Oba koeficienty  $R^2$  sú približne rovnako vysoké, čo dokazuje pozitívnu koreláciu medzi pomerom absorbancií charakteristických pásov a obsahu PHB v baktériách.

Treba podotknúť, že pripravené vzorky boli sušené v termostate pri  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , čím sa zvýšila ich kryštalickosť. Z tohto dôvodu sa vyskúšalo sušiť produkčné médiá priamo na ATR kryštáli s predpokladom, že ich kryštalickosť bude nižšia (viď 3.3.2). Meranie prebehlo rovnakou metódou, ako v predchádzajúcom prípade.

Z výsledného spektra (v spektrálnom rozsahu  $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$ ) boli vybrané charakteristické pásy-  $1734\text{ cm}^{-1}$  (PHB),  $1180\text{ cm}^{-1}$  (PHB),  $1540\text{ cm}^{-1}$  (amidy v bielkovinách). Ukážka emisného spektra pre médium s najvyšším obsahom PHB sa nachádza v prílohe.

Pomery hodnôt boli vynesené na percentuálnom zastúpení PHB, ako možno vidieť na obrázkoch a),b) na nasledujúcej strane (*Obrázok 14*). Korelácia medzi pomeru (pásov charakteristických pre emisiu PHB a štandardom) a obsahom PHB sa objavuje až pre obsahy PHB, ktoré sú vyššie ako 40 %. Pre nižšie obsahy PHB nie je metóda dostatočne citlivá. Príčinou nízkej citlivosti pri meraní médií NB, 5/3 je to, že pásy sú prekryté zbytkovou biomasou.



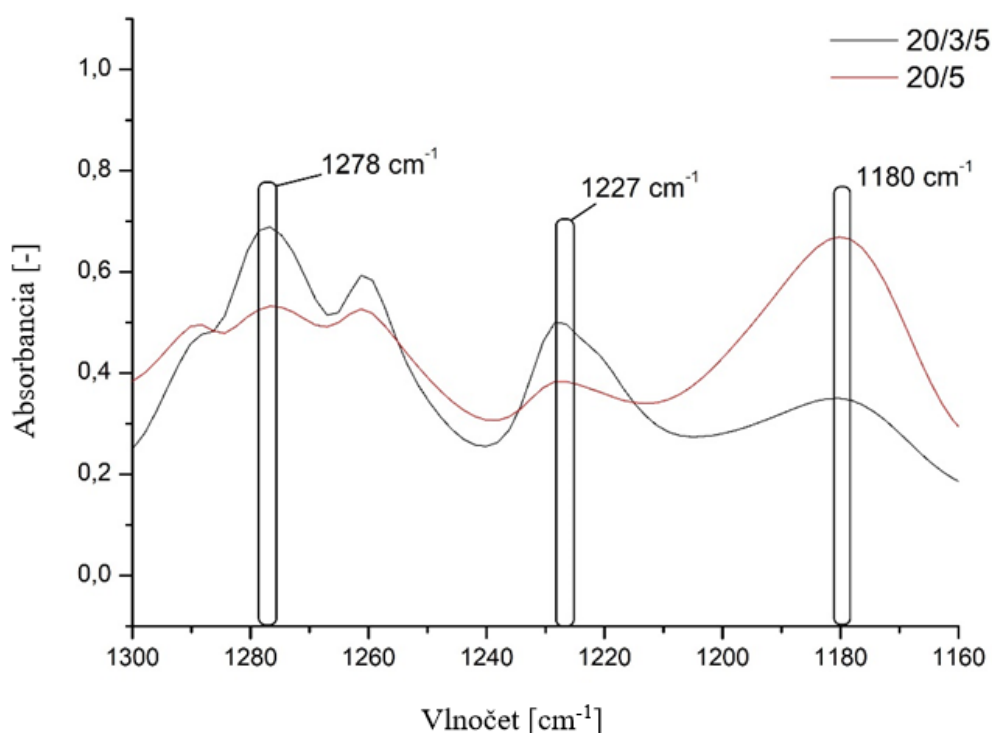
Obrázok 14 Pomer pásyov pri a) 1730  $\text{cm}^{-1}$  a b) 1180  $\text{cm}^{-1}$  ku pásu pri 1540  $\text{cm}^{-1}$  boli vynesené na obsahu PHB

Pre produkčné médiá s vysokým obsahom PHB je sušenie vzorky priamo na kryštáli vhodnou metódou stanovenia PHB granúl pre kultúry s vyšším obsahom PHB. Koeficient spoľahlivosti  $R^2$  (Obrázok 14) ukazuje vysokú závislosť pomeru absorbancií na percentuálnom obsahu PHB (nad 40 hm.%) zistených plynovou chromatografiou.

Pri meraní boli okrem vyššie uvedených pásov, zistené aj iné charakteristické pásy. Tie určujú formu, v akej sa daný polymér nachádza - či je v stave kryštalickom, alebo amorfnom. V prípade výskytu pásov pri oblastiach 1278, 1227  $\text{cm}^{-1}$  sa polymér nachádza v stave kryštalickom, naopak pás pri 1180  $\text{cm}^{-1}$  hovorí o amorfnom tvare polyméru.

Na nasledujúcom obrázku sú vybrané dve produkčné médiá. Jedná sa o médiá 20/3/5 a 20/5, ktoré majú približne rovnaký obsah PHB (65,4 %). Obe médiá boli pripravované rovnakým spôsobom (viď kapitolu 3.2.2), ale z grafu (Obrázok 15) je možné vidieť, že sa líšia vo forme, v akej sa PHB nachádza.





Obrázok 15 FT-IR spektrum pre médiá 20/3/5 a 20/5 zamerané na pásy charakterizujúce kryštalickosť/amorfnosť polyméru

Spektrá produkčných médií boli normalizované. Modrá krivka označuje médium 20/3/5, ktoré vytvára pásy v oblastiach 1278 a 1227  $\text{cm}^{-1}$ , charakteristické pre kryštalický stav polyméru. Pás pri 1278  $\text{cm}^{-1}$  je výrazne vyšší ako pás pri 1227  $\text{cm}^{-1}$ , na zistenie kryštalickosti PHB je teda praktickejší a citlivejší. Naopak, pás v oblasti 1180  $\text{cm}^{-1}$  klesá s rastúcou kryštalickosťou. Zo spektier (Obrázok 15) je vidieť, že médium 20/5 (vyznačené rúžovou krivkou) vytvára výrazne vyšší pás v oblasti 1180  $\text{cm}^{-1}$ , a nižšie pri druhých dvoch pásoch charakteristických pre kryštalickú formu PHB oproti médiu 20/3/5 s prakticky totožným celkovým obsahom PHB.

Kryštalickosť a amorfnosť sú dôležitými znakmi charakterizujúcimi polyméry. Metódou infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou vznikajú pásy, určujúce o akú formu polyméru ide. Toto zistenie umožňuje metódou FTIR nielen kvantitatívne stanoviť obsah PHB v bunkách baktérií s vysokou presnosťou, ale navyše aj určiť, či sa polymér nachádza v amorfnom, alebo kryštalickom stave. Technika FTIR je rýchla, nie je deštruktívna, takže je možné analyzovanú vzorku stanoviť aj inými metódami. Z výsledkov je vidieť, že je vysoko spoľahlivá. Malou nevýhodou metódy je potrebná úprava vzorky, ktorá spočíva v sušení, pretože nie je ňou možné merať mokré vzorky. Na druhú stranu príprava nie je ani zďaleka taká náročná ako je to pri zrovnávajúcej metóde- plynovej chromatografii.

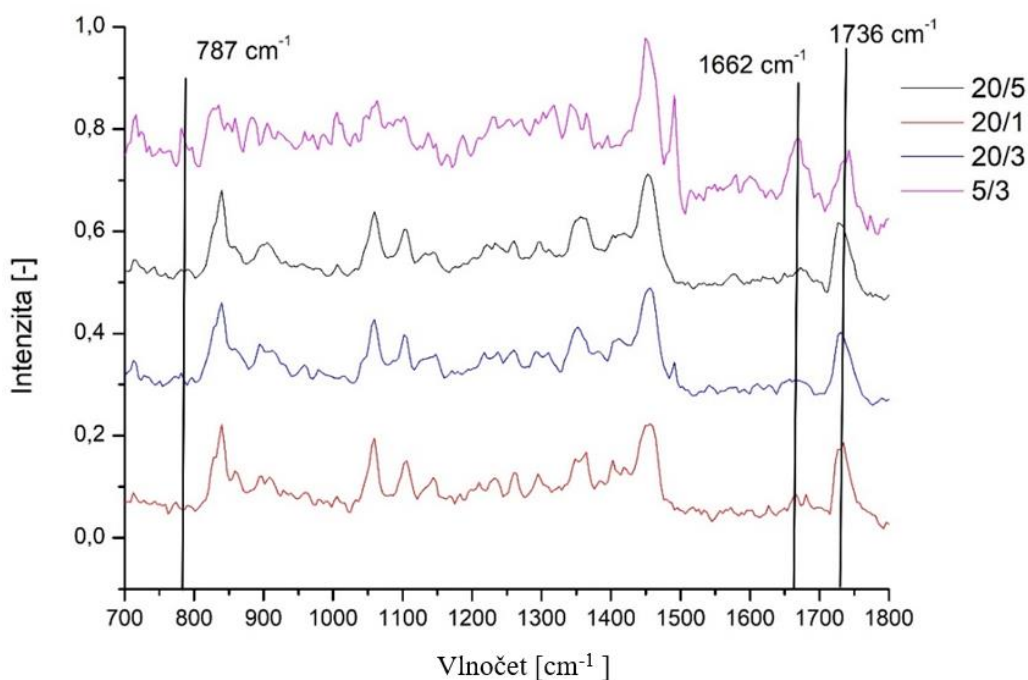
#### 4.3.2 Ramanova spektrofotometria

Ramanova spektroskopia slúži ako dopĺňajúca technika k FTIR. Jedným z cieľoch tejto bakalárskej práce bolo zistiť, či sa dá táto metóda použiť samostatne ku kvantitatívnemu stanoveniu PHA. Na rozdiel od infračervenej spektroskopie, Ramanova spektroskopia nie je citlivá na zbytkovú vlhkosť, čo by urýchlilo prípravu vzorky.

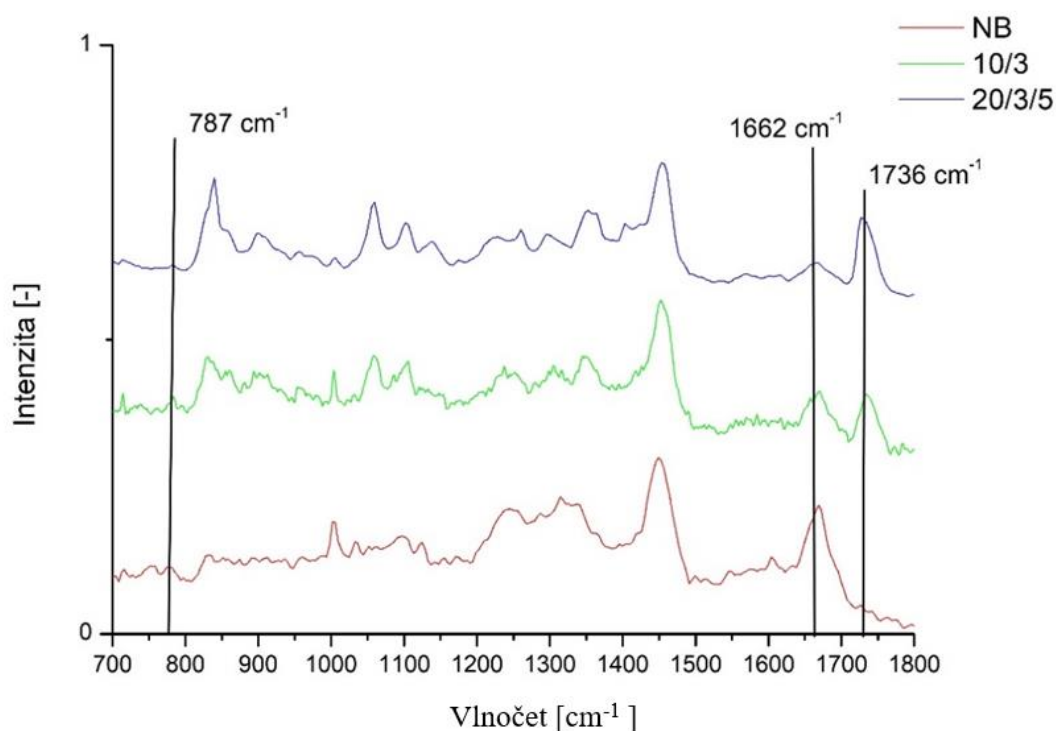
Meranie pripravených vzoriek (viď kapitolu 3.3.3) prebiehalo na spektrofotometri Nicolet iS50, v tomto prípade doplnenom o FT-Ramanský modul. Vzorky boli merané v spektrálnom rozsahu 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  s krokom cca 4  $\text{cm}^{-1}$  a počtom 1024 skenov.

Zo získaného emisného spektra boli vybrané pásy na zistenie korelácie s obsahom PHB. Výslednú časť spektra je vidieť na obrázkoch nižšie (Obrázok 16, Obrázok 17).

Pás pri vlnovej dĺžke 1736  $\text{cm}^{-1}$  sa ukázal ako najvhodnejší, pretože charakterizoval abospciu žiarenia PHB bez rušivého vplyvu iných bakteriálnych komponentov. Štandardom boli vybrané pásy pri 1662  $\text{cm}^{-1}$  (charakterizujúcemu amid v zbytkovej biomase) a 787  $\text{cm}^{-1}$  (pás charakteristický pre DNA), rovnako ako u autorov publikácie. [35]



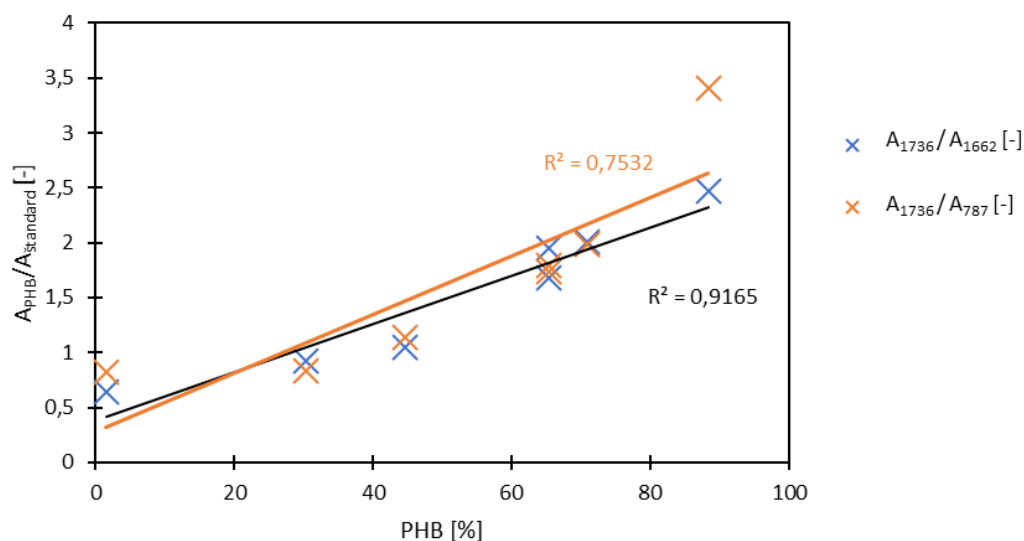
Obrázok 16 Spektrum v závislosti intenzity na vlnovej dĺžke pre médiá 20/5;20/1;20/3;5/3



Obrázok 17 Spektrum závislosti intenzity na vlnovej dĺžke pre médiá NB,10/3;20/3/5

Spektrá produkčných médií boli navzájom normalizované a pre prehľadnosť posunuté po osy y (charakterizujúcej intenzitu). Na obrázkoch (Obrázok 16, Obrázok 17) možno vidieť ako sa pás pri vlnovej dĺžke  $1736\text{ cm}^{-1}$  s rastúcim obsahom PHB zvyšuje. Naopak pri narastajúcom vrchole pásu pri  $1662\text{ cm}^{-1}$  (amid) ako je to na Obrázok 16 pri médiu 5/3 sa obsah PHB znižuje. Pri médiu NB (Obrázok 17) nie je vidieť žiadny zreteľný pík charakterizujúci PHB, ale naopak pás pri  $1662\text{ cm}^{-1}$  je výrazný.

Ramanovou spektroskopiou bola dokázaná korelácia medzi pomerom intenzít pásov  $1736\text{ cm}^{-1}$  (PHB) a  $1662\text{ cm}^{-1}$  (amid) ako aj  $1736$  a  $787\text{ cm}^{-1}$  (DNA), s percentuálnym obsahom PHB zisteným plynovou chromatografiou. Ako je možné vidieť z grafu (Obrázok 18), s rastúcim množstvom polyméru rastie následne aj výška emisného pásu pre PHB. Pri pomere  $1736\text{ cm}^{-1}$  k pásu  $1662\text{ cm}^{-1}$  je koeficient spoľahlivosti  $R^2$  vyšší, ale to môže byť spôsobené kvôli bodu s najvyšším obsahom PHB. Môže to znamenať, že pás pri  $787\text{ cm}^{-1}$  je citlivejší na charakterizáciu vyššej koncentrácie PHB, ako je možné vidieť pri médiu s obsahom 88,37 %. Produkčné médium NB s malým obsahom PHB sa vymyká tejto závislosti.



Obrázok 18 Normalizácia spektier pásu PHB k pásu štandardu, vynesená na obsahu PHB

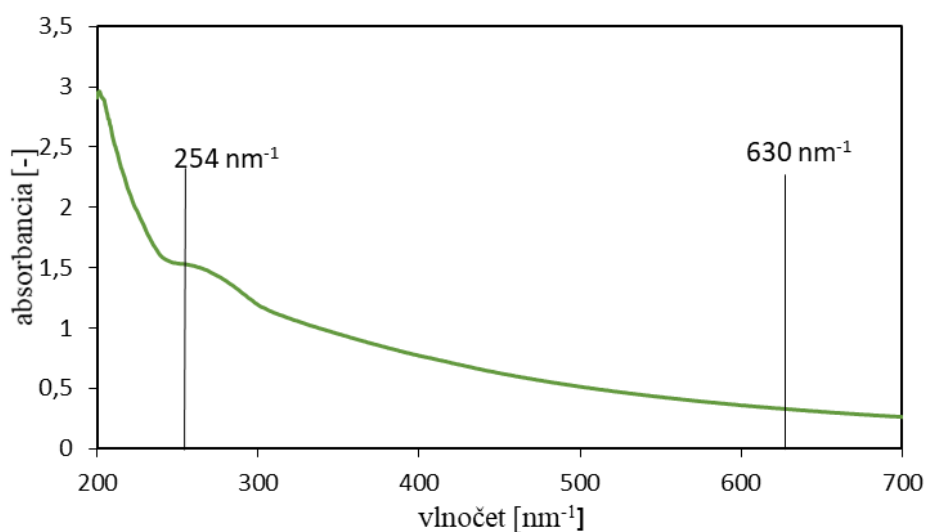
Ramanova spektrofotometria sa vo výsledku ukázala byť vhodnou metódou na stanovenie množstva PHB v bunkách baktérie *Cupriavidus necator* H16. Výhodou je rýchlosť prípravy vzorky, pretože nie je nutné ju úplne vysušiť a tiež rýchlosť merania. Výsledky je možné sledovať v priebehu merania.

#### 4.4 Turbidimetria

Po predchádzajúcich metódach, v ktorých sa merali suché a upravené vzorky, sa vyskúšalo meranie produkčných médií bez úpravy, v pôvodnom kvapalnom stave. Využil sa princíp turbidimetrie – sledovalo sa ako veľmi baktérie rozptyľujú UV-VIS žiarenie. Predpokladalo sa, že baktérie s veľkým počtom PHB granúl toto žiarenie budú rozptyľovať viac, ako tie s nízkym obsahom PHB. Meranie prebiehalo na UV-VIS spektrofotometri Hitachi U-3900H.

Pred zisťovaním rozptylu žiarenia granulami PHB bolo potrebné zistiť počet buniek v jednotlivých médiách. Na stanovenie počtu buniek sa použila metódou CFU (viď kapitolu 3.2.3). Každé z pôvodných médií sa 15krát riedilo a riedené roztoky boli merané na spomínanom prístroji.

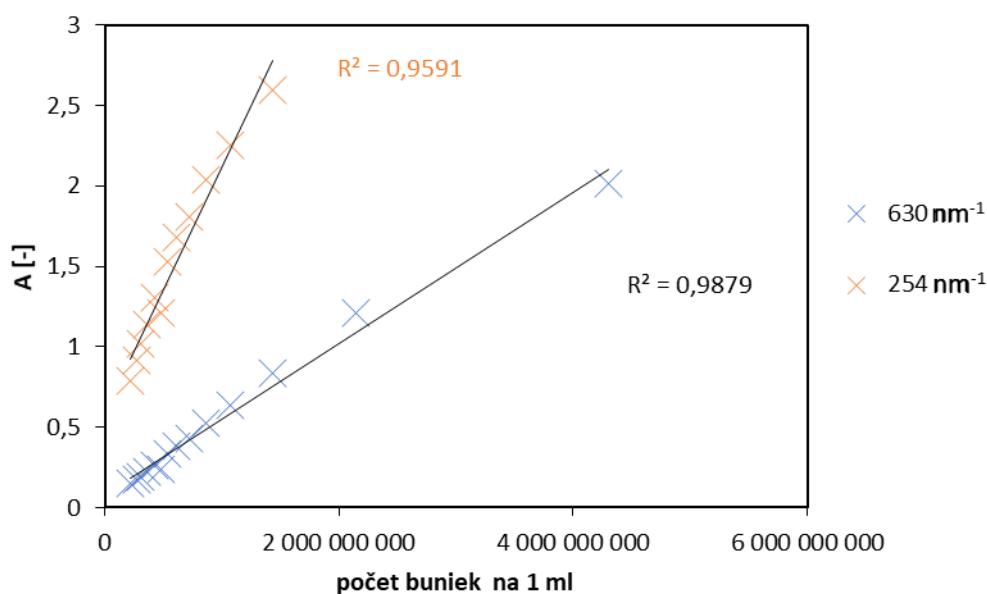
Závislosť absorpcie na vlnovej dĺžke je možné vidieť na nasledujúcej strane (Obrázok 19) pre médium 10/3 s vyznačenými vlnovými dĺžkami.



Obrázok 19 Závislosť absorbancie na vlnovej dĺžke pre médium 10/3

Pre každé riedenie boli vzaté absorbancie pri vlnových dĺžkach 254 a 630 nm<sup>-1</sup>. Vlnová dĺžka v UV oblasti je citlivejšia, avšak v tejto oblasti sa prejavuje absorbancia zbytkovej biomasy (predovšetkým absorpciou DNA), čo môže mať vplyv na výsledky. Získané absorbancie sa vyniesli v závislosti na počte buniek. Z najlineárnejšieho úseku (preloženého lineárnou priamkou) bola vypočítaná smernica. Táto smernica je nepriamou charakteristikou toho, ako je rozptyl svetla, citlivý na prítomnosť PHB granúl nachádzajúcich sa v baktériálnych bunkách.

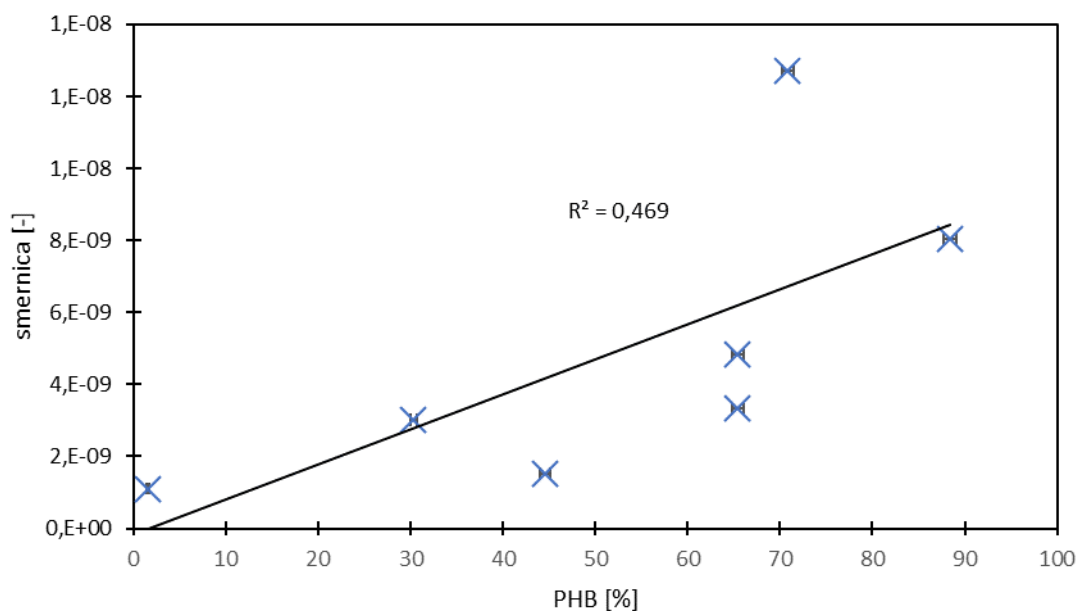
Závislosť absorbancie na počte buniek (na 1 ml) je možné vidieť na grafe nižšie (Obrázok 20) pre médium 10/3. V tomto prípade bol koeficient spoľahlivosti R<sup>2</sup> vyšší pri absorbancií pri vlnovej dĺžke 630 nm<sup>-1</sup>.



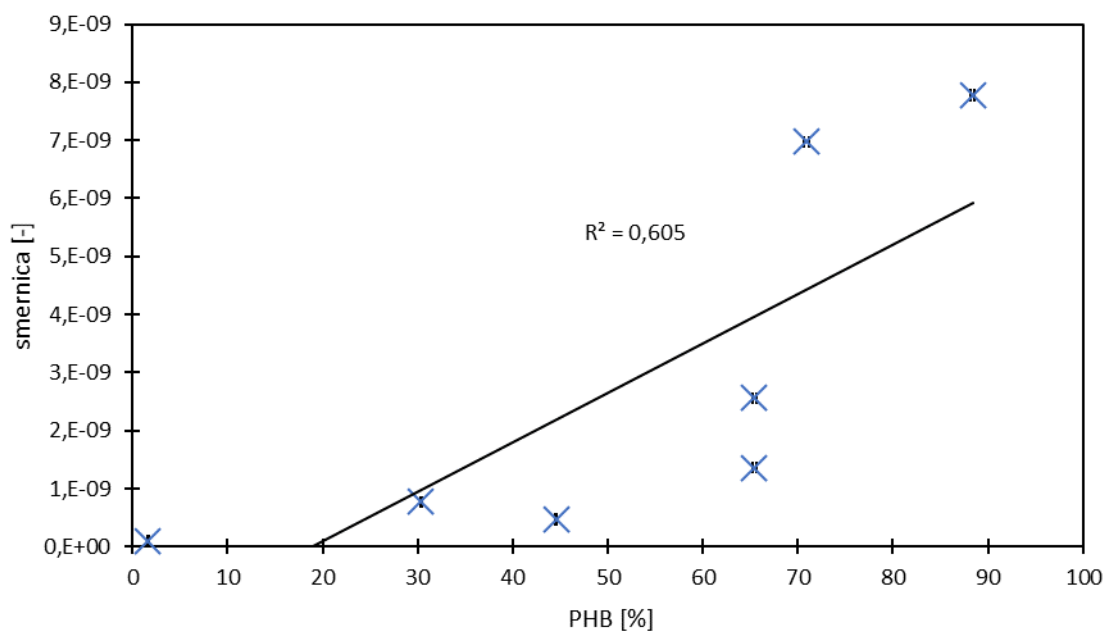
Obrázok 20- Závislosť absorbancie na počte buniek pre roztok 10/3 s obsahom 44 % PHB

Z najviac lineárneho úseku bola funkciou „SLOPE“ vypočítaná smernica, predstavujúca rozptyl. Výsledné smernice boli vynesené do grafu v závislosti na percentuálnom zastúpení PHB (Obrázok 21, Obrázok 22)

Pri absorbancií  $254\text{ nm}^{-1}$  je faktor spoľahlivosti  $R^2$  nižší ako 0,5. V tejto oblasti absorbuje UV žiarenie biomasa, ktorá skresľuje výsledky.



Obrázok 21 Závislosť rozptylu na obsahu PHB pri  $254\text{ nm}^{-1}$



Obrázok 22 Závislosť rozptylu na obsahu PHB pri  $630\text{ nm}^{-1}$

V prípade absorpcie viditeľného svetla pri  $630\text{ nm}^{-1}$  je závislosť na obsahu PHB lineárnejšia a faktor spoľahlivosti  $R^2$  je až 0,6. Pri tejto vlnovej dĺžke dochádza k rozptylu žiarenia na povrchu buniek a granulách PHB.

Výsledky z turbidimetrie meranej UV-VIS spektrofotometrom dokazujú že medzi smernicou závislosti efektívnej absorpcie na počte buniek (charakterizujúcou rozptyl svetla na ultraštruktúre buniek) a obsahom PHA je slabá pozitívna korelácia pri vlnovej dĺžke  $630\text{ nm}^{-1}$ . Treba podotknúť, že meranie pripravených roztokov prebehlo kvôli časovej náročnosti iba jedenkrát, čo sa mohlo odzrkadliť aj na výsledkoch. Príprava bola jednoduchá, avšak časovo náročná, rovnako ako samotné meranie. Počas merania absorpcie bolo nutné neustále meniť vzorky.

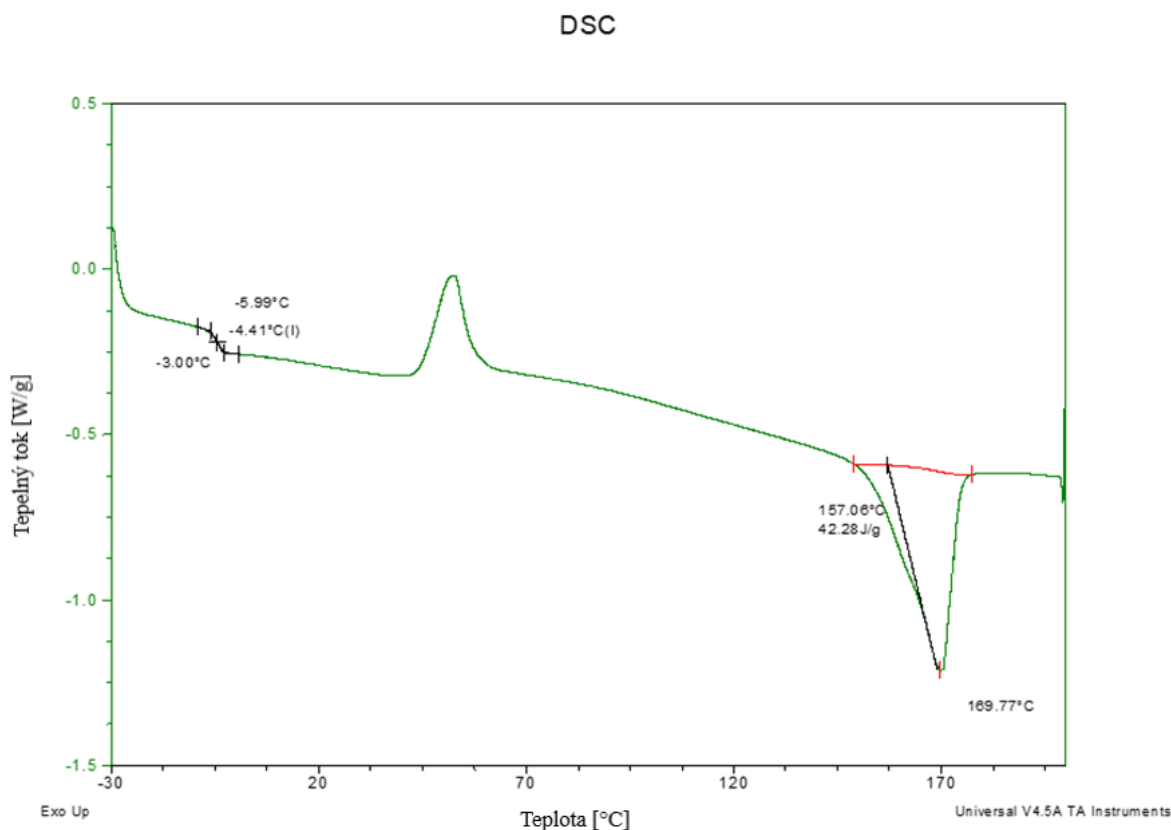
## **4.5 Termické analýzy**

Druhou širšou skupinou testovaných metód boli termické analýzy, založené na zahrievaní, alebo chladení vzoriek, spojenými s fázovými premenami a termickou degradáciou vzoriek. Metódami v tejto skupine sú diferenčná skenovacia kalorimetria a termogravimetrická analýza.

### **4.5.1 Diferenčná skenovacia kalorimetria**

Metódou diferenčnej skenovacej kalorimetrie (DSC) boli skúmané fázové prechody PHB v granulách behom chladenia a spätného zahrievania na prístroji DSC Q2000, TA Instruments. Vzorky boli pripravené rozmrazením produkčných médií a vysušením takým spôsobom, aby sa zachoval amorfný tvar PHB (v kapitole 3.3.5).

Priebeh merania je možné rozdeliť na tri cykly- zahrievanie, chladenie, opätovné zahrievanie. V prvom cykle, pri zahrievaní polyméru dochádza k zmene fázového stavu-topeniu. Polymér prechádza z tuhého stavu do kvapalného. Znižovaním teploty v druhom cykle PHB tuhne. Tretí cyklus, v ktorom dochádza k opätovnému zahrievaniu, je možné vidieť na nasledujúcom obrázku (*Obrázok 23*).



Obrázok 23 Priebeh DSC analyzovaného média 20/3

Prvý skok charakterizuje sklený prechod, charakteristický pre PHB v amorfnom stave. Nachádza sa cca pri teplote  $-4,41^{\circ}\text{C}$ . Zahrievaním dochádza ku kryštalizácii polyméru pri teplote cca  $50^{\circ}\text{C}$ . Kryštalizáciu charakterizuje pík pri spomínanej teplote. Po skryštalizovaní vplyvom ďalšieho zahrievania dochádza opäť k topeniu polyméru (pík smerom nadol).

K popísanému javu nedochádza pri všetkých médiách. Jedná sa iba o média 10/3;20/3/5;20/5/5/3 a 20/3. Koncentrácia PHB v spomínaných produkčných médiách sa pohybuje v rozsahu 44,57 - 78,87 %. Pri ostatných médiách (NB, 20/1) sklený prechod v 3. cykle nenastal. Výsledné vybrané hodnoty (Teplota skleného prechodu  $T_m$ , teplota pri začiatku topenia  $T_l$ , množstvo tepla, ktoré látka prijme pri skupenskej premene  $Q$ , teplota po ukončení premeny  $T_2$  z 3. cyklu) je možné vidieť v tabuľke v prílohe (Tabuľka 6).

Produkčné médiá by bolo možné porovnať na základe množstva prijatého tepla. Pri médiu 20/1 (88 %) je množstvo prijatého tepla v 1. a 3. cykle vyššie (55,41; 55,8 J/g) ako pri ostatných médiách. Množstvo prijatého tepla pre ostatné vzorky nekoreluje s obsahom PHB.

Vzniknuté fázové prechody a píky pri použití techniky DSC, dávajú informácie o kryštalickom, alebo amorfnom stave polyméru. Zaujímavý je fakt, že po zahrievaní a chladení sa v treťom cykle nachádza PHB opäť v amorfnej forme. Bližšie vysvetlenie týchto javov už nebolo cieľom zistenia v tejto práci.

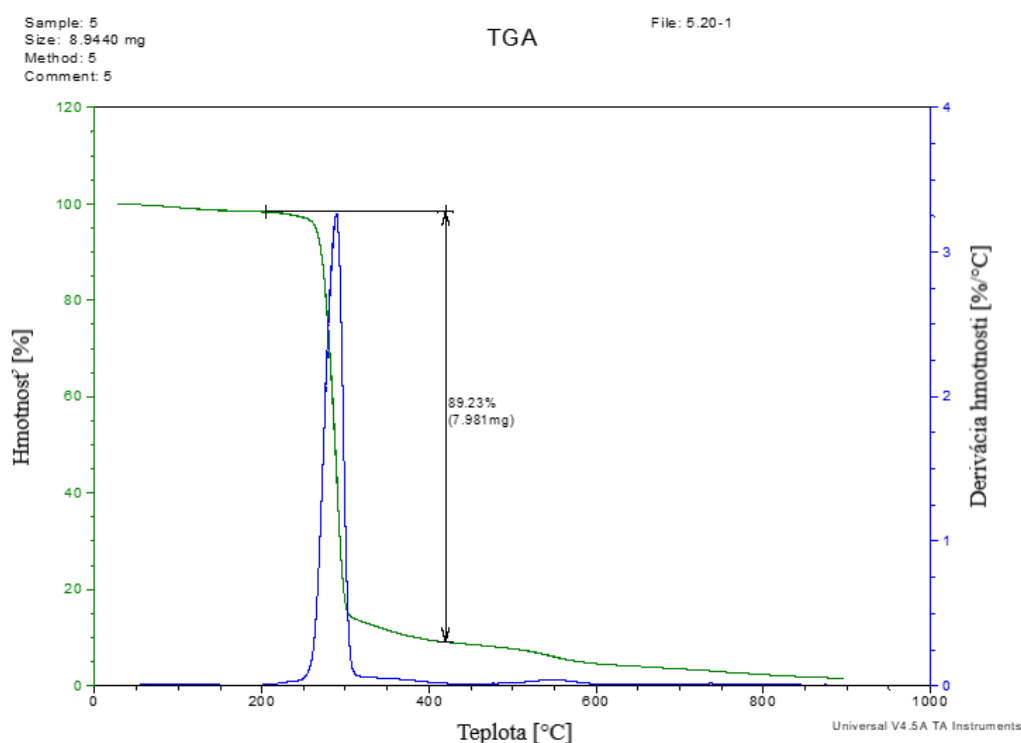


#### 4.5.2 Termogravimetrická analýza

Meranie TGA metódou prebiehalo za postupného zvyšovania teploty s krokom 10 °C/min na termogravimetrickom analyzátore Q5000. Teplota sa zvyšovala až na 900 °C, kedy došlo k spáleniu celkového množstva biomasy. Čas merania bol 90 min.

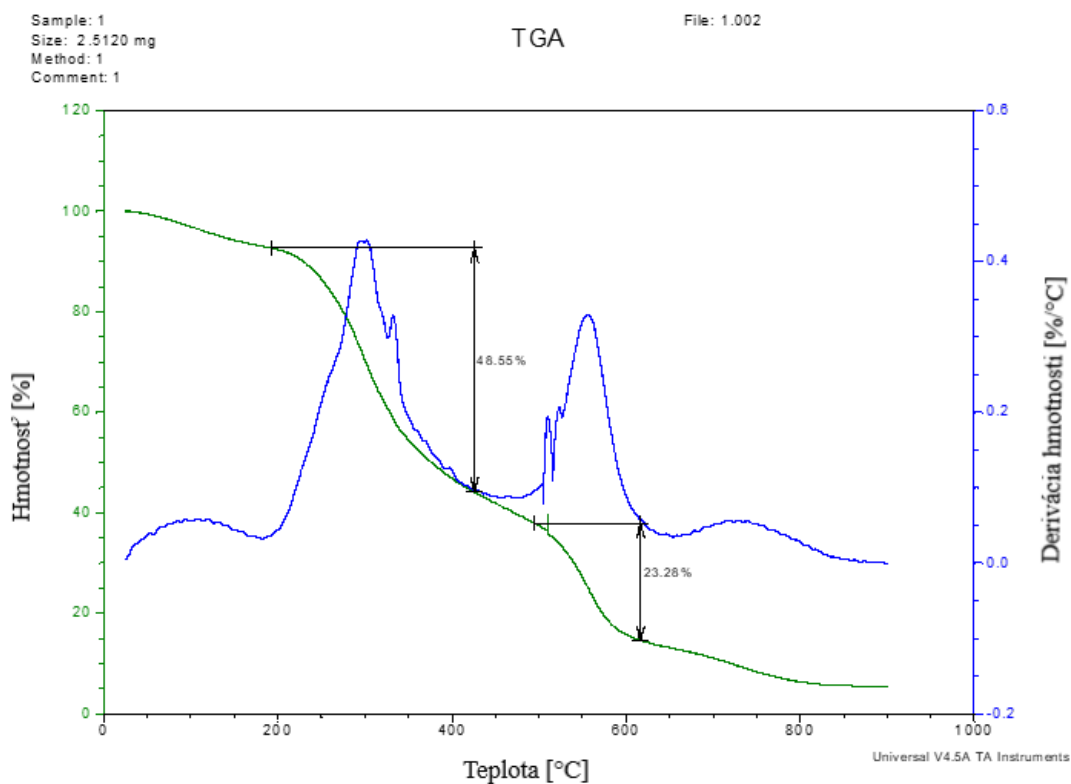
Výstup z termogravimetrickej analýzy, vyjadruje závislosť úbytku hmotnosti na teplote. Hmotnosť so zvyšujúcou sa teplotou postupne klesá. Vedľajšia os charakterizuje rýchlosť spaľovania na teplote. Pomocou vedľajšej osi sa zistilo rozmedzie, počas ktorého dochádzalo k spaľovaniu. Pri všetkých produkčných médiách možno vidieť úbytok hmotnosti v rozmedzí teplôt od 200 °C po 400 °C. Tento úbytok zodpovedá spaľovaniu PHB.

Pri médiu 20/1, s najväčším obsahom PHB (*Obrázok 24*) je tento úbytok hmotnosti vzorky v rozsahu 200 - 400 °C najvýraznejší. Percentuálny pokles hmotnosti je až 89,23% PHB.



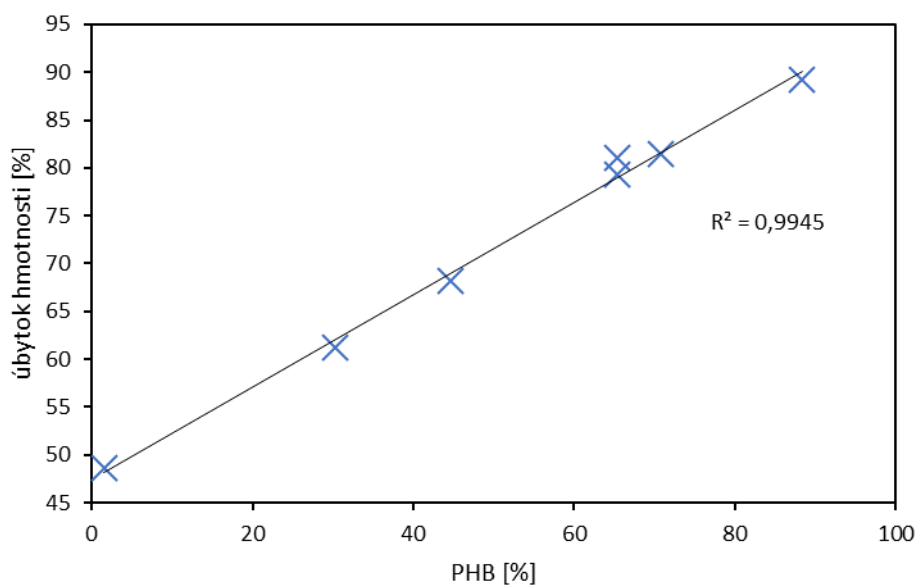
Obrázok 24 Priebeh TGA vzorky 20/1

V prípade média NB (*Obrázok 25*) s nízkym obsahom PHB hmotnosť vzorky klesala postupne. Modrá krivka vyjadrujúca rýchlosť spaľovania ukazuje, že rast nastáva najskôr od teploty 200 °C a do približne 300 °C, kedy začína prudko klesať. Nárast opäť nastáva pri teplote 500 °C a klesá už pri teplote 550 °C. V prvom úbytku hmotnosti dochádza k spaľovaniu minoritného obsahu PHB a čiastočne aj k spaľovaniu labilných zložiek biomasy. Pri druhom úbytku hmotnosti sa spaľuje zvyšková biomasa.



Obrázok 25 Priebeh TGA vzorky NB

Percentuálne úbytky hmotnosti vzorky, zistené pri všetkých siedmich médiách v rozmedzí teplôt 200 - 400 °C boli vynesené do závislosti na ich obsahu PHB (Obrázok 26). Z výsledku je možné vidieť lineárnu závislosť percentuálnom úbytku hmotnosti na obsahu PHB. V tomto prípade je faktor spoľahlivosti  $R^2=0,9945$ . To vyjadruje najvyššiu lineárnu závislosť spomedzi všetkých skúmaných metód.



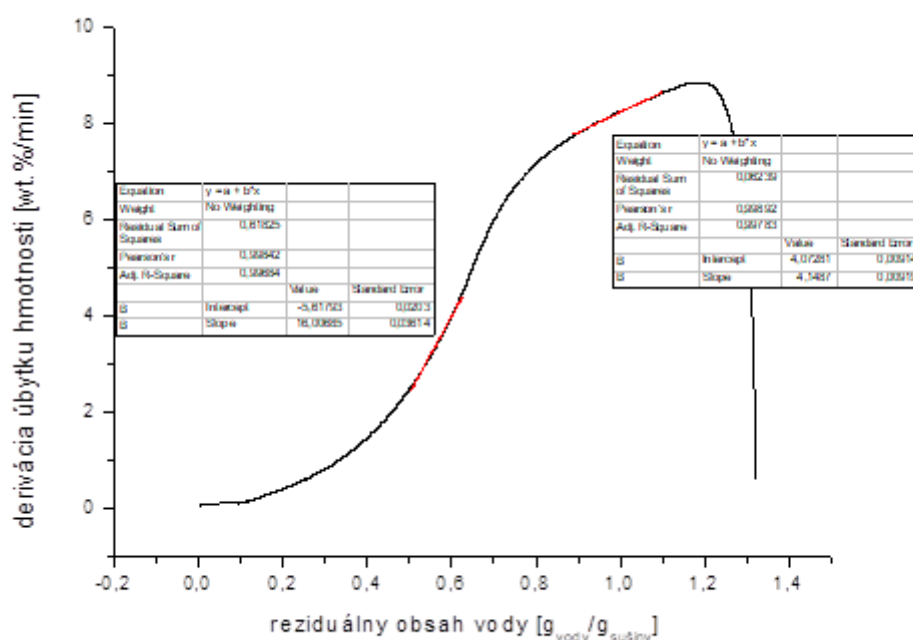
Obrázok 26 Závislosť úbytku hmotnosti (pri 200-400 °C) na obsahu PHB

Príprava na meranie termogravimetrickou analýzou je nenáročná a rýchla. Samotné meranie netrvá dlhšie ako 90 min. Spomedzi všetkých metód použitých na stanovenie (FTIR, Ramanova spektroskopia, turbidimetria) sa jedná o najúčinnnejšiu a najspoľahlivejšiu metódu na kvantitatívne stanovenie PHA v baktériách. Výhoda oproti plynovej chromatografii spočíva v rýchlosti merania, nepoužívaní iných chemikálií. Na druhej strane, rovnako ako v prípade GC je termogravimetrická analýza tiež deštruktívnou metódou, pretože pri nej dochádza k spaľovaniu vzorky.

### 4.5.3 Izotermické sušenie

V rámci termogravimetrickej analýzy boli vzorky (pripravené v kapitole 3.3.5) merané aj pri izotermickom sušení pri konštantnej teplote 70 °C. Počas sušenia dochádzalo k úbytku hmotnosti spôsobenej stratou vody. Po 40 min sa teplota začala zvyšovať na 200 °C s krokom 10 °C/min, aby sa zistila hmotnosť sušiny, z ktorej bola vypočítaná celková hmotnosť vody na začiatku merania. Meraných je v tomto prípade šesť zo siedmich médií, pretože médiá 20/3/5 a 20/5 mali podobný obsah PHB. Z časových dôvodov sa zmeralo iba jedno z nich- médium 20/3/5.

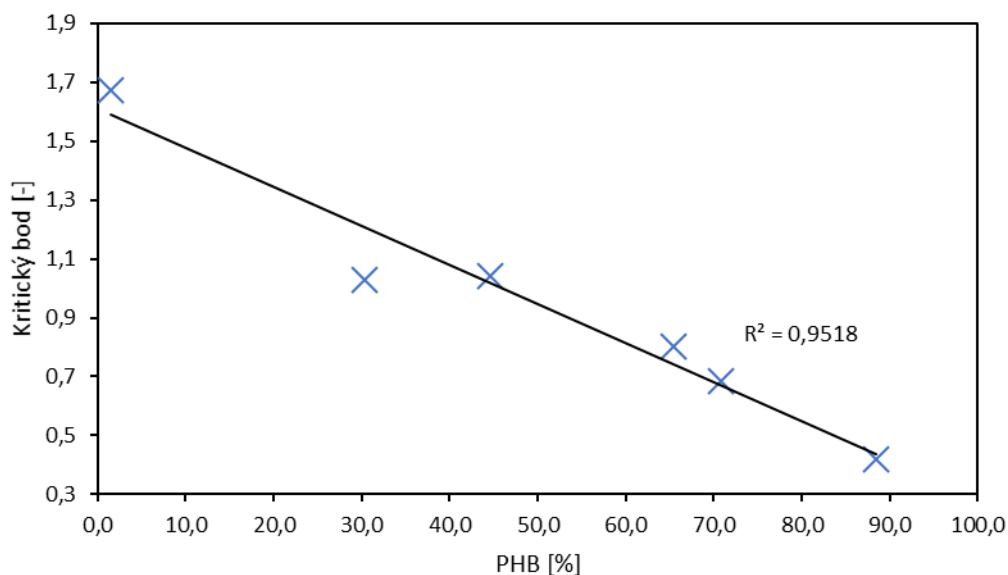
Na obrázku možno vidieť priebeh sušenia produkčného média 20/3/5 (*Obrázok 27*). Priebeh sušenia je zobrazený v smere sprava doľava v závislosti rýchlosti sušenia (derivácia obsahu vody) na podiele hmotnosti vody k hmotnosti sušiny. Nastávajú dva poklesy v hmotnosti. Prvý nastáva na začiatku merania, kedy dochádza k odpareniu voľnej extracelulárnej vody. Derivácia úbytku hmotnosti (tj. rýchlosť sušenia vzorky) klesá pomaly. Druhý pokles hmotnosti nastáva približne od hodnoty 0,7. Od bodu 0,7 je možné vidieť prudší spád v rýchlosti sušenia.



Obrázok 27 Závislosť derivácie úbytku hmotnosti na reziduálnom obsahu vody u média 20/3/5

Najlineárnejšie úseky boli v oboch prípadoch preložené priamkami a z výsledných rovníc sa zistil ich priesečník- kritický bod. Od kritického bodu sa vo vzorke nenachádza už žiadna extracelulárna voda. Množstvo intracelulárnej vody v baktériách záviselo od obsahu PHB. V prípade väčšieho množstva vody baktérie obsahovali menej PHB granúl a naopak.

Meranie prebiehalo 3krát a výsledné hodnoty z každého merania boli spriemerované. Kritické body boli vynesené na percentuálnom obsahu PHB (Obrázok 28), ako je možné vidieť v grafe nižšie.



Obrázok 28 Závislosť kritických bodov na obsahu PHB

Výsledná korelácia medzi kritickými bodmi a obsahu PHB je záporná. Tento výsledok dokazuje, že baktérie s vyšším relatívnym obsahom intracelulárnej vody logicky obsahujú menšie množstvo PHB.

Termické analýzy sa spomedzi všetkých metód použitých v tejto bakalárskej práci, ukázali byť najúčinnnejšie. V prípade sledovania poklesu hmotnosti pri zahrievaní až na teplotu 900 °C, ale aj v skúmaní množstva intracelulárnej vody v baktériách je možné zistiť obsah PHB.

## 5 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo stanoviť obsah polyhydroxyalkanoátov v bakteriálnych bunkách s využitím vhodných metód. Využili sa predovšetkým vibračné a termické techniky, ktoré slúžili na kvantitatívne a kvalitatívne stanovenie a boli porovnávané s plynovou chromatografiou.

Modelovým organizmom, produkujúcim granule PHA, bola baktéria *Cupriavidus necator* H16. Kultivácia prebiehala v produkčných médiách, ktoré sa líšili v obsahu cukru, síranu amónneho a prídavkom peptonu. Rozdielne podmienky produkčných médií mali vplyv na rast baktérií a množstvo PHA granúl, ktoré produkovali. Obsah PHA (pohybujúci sa v rozmedzí 1,5 - 88,9 %) bol stanovený plynovou chromatografiou- najviac využívanou metódou stanovenia. Kvôli vysokej časovej náročnosti, nebezpečnými látkam, ktoré sa pri nej využívajú, a tiež faktu, že nie je opakovateľná, sa hľadali iné alternatívne metódy. Jednalo sa o FTIR, Ramanovu spektroskopiu, turbidimetriu, termogravimetriu a DSC.

Pri infračervenej spektroskopii s Fourierovou transformáciou bol obsah PHA stanovený pomerom absorbancií žiarenia charakteristických pásov polyméru, ku takým pásom, kde polymér neabsorboval žiarenie. Po vynesení normalizovaných hodnôt na obsahu PHA (zisteného plynovou chromatografiou) bola dokázaná pozitívna korelácia. Okrem kvantitatívneho stanovenia sa FTIR ukázala byť vhodnou metódou na stanovenie kryštalickosti, alebo amorfnosti polyméru.

Ramanova spektroskopia vychádzala z rovnakého princípu ako FTIR. Aj v tomto prípade bola preukázaná lineárna závislosť medzi pomerom intenzity pri určitých vlnových dĺžkach ku vnútornému štandardu a obsahom PHA v bunkách. Závislosť bola menej lineárna ako pri FTIR a pri meraní sa nevyskytovali žiadne charakteristické pásy, ktoré by označovali formu, v akej sa polymér v bunkách nachádzal.

Absorbancia PHA v bunkách bola tiež stanovená turbidimetriou. Metódou bolo možné získať lineárnu závislosť medzi rozptylom (získaného z absorbancie rôznych koncentrácií na počte buniek) a percentuálnom zastúpení PHA. Sledovali sa absorbancie pri dvoch vlnových dĺžkach ( $254\text{ nm}^{-1}$  a  $630\text{ nm}^{-1}$ ), z ktorých absorbancia vo viditeľnom svetle sa ukázala byť vhodnejšia. Výsledky napriek tomu nie sú stále také lineárne na obsahu PHA ako pri ostatných metódach. Nevýhodou bola časová náročnosť pri príprave vzoriek a pri samotnom meraní. Avšak stále sa jednalo o kratší čas, ako pri použití plynovej chromatografie.

Technika DSC umožnila sledovať fázové prechody počas zahrievania, chladenia a opätovného zahrievania polyméru. Fázové prechody boli charakterizované sklenými prechodmi a píkmi, vyznačujúcimi kryštalizáciu. Touto technikou bolo možné sledovať, kedy sa polymér nachádza v stave amorfnom, alebo kryštalickom.

Spomedzi všetkých metód bola najefektívnejšou termogravimetrická analýza. Počas zvyšovania teploty ubúdala hmotnosť vzorky. Výrazný úbytok nastal v oblasti  $200 - 400\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ktorá zodpovedala spaľovaniu PHA. Percentuálne úbytky hmotnosti jednotlivých médií boli vynesené na obsahu PHA

zisteného plynovou chromatografiou. Koeficient spoľahlivosti  $R^2$  sa v tomto prípade rovnal až 0,99. Príprava vzorky bola nenáročná a z hľadiska času trvalo samotné meranie okolo 90 min.

Pri meraní nesusušených vzoriek za izotermických podmienok (70 °C) sa stanovoval relatívny obsah intracelulárnej vody. Závislosť bola nepriamoúmerná, čo znamená, že s vyšším obsahom intracelulárnej vody klesá množstvo PHA bakteriálnych bunkách.

V tejto bakalárskej práci boli úspešne otestované vhodné metódy na stanovenie PHA v bakteriálnych bunkách. Medzi najvhodnejšie z nich patrila FTIR, Ramanova spektroskopia a termogravimetrická analýza, ktoré stanovujú kvantitatívny obsah polyméru s vysokou presnosťou takmer porovnateľnou s plynovou chromatografiou. Úprava vzorky a samotné meranie neboli časovo náročné a navyše v prípade techniky FTIR bolo možné určiť amorfný, alebo kryštalický stav polyméru.

1. Methods for identification, quantification and characterization of polyhydroxyalkanoates-a review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOASSAYS*. 2016, , 7. ISSN 2278-778X.
2. FLICKINGER, Michael C. a Stephen W. DREW, c1999. *The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: Wiley. ISBN 978-047-1138-228.
3. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications, 2018. *International Biodeterioration & Biodegradation*. (126), 45-56.
4. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications, 2002. *Polymer testing*. **4**(21), 433-442. ISSN 0142-9418.
5. Controlled degradation of polyhydroxybutyrate via alcoholysis with ethylene glycol or glycerol, 2006. *Polymer Degradation and Stability*. **4**(91), 856-861.
6. Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers., 1999. *Int J Biol Macromol*. **20**(25), 1-3.
7. DE KONING, G.J.M. a P.J. LEMSTRA, 1993. Crystallization phenomena in bacterial poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: 2. Embrittlement and rejuvenation. *Polymer*. **34**(19), 4089-4094. DOI: 10.1016/0032-3861(93)90671-V. ISSN 00323861. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003238619390671V>
8. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging, 2014. *EXPRESS Polymer Letters*. **11**(8), 791-808.
9. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements, 2016. *International journal of biological macromolecules*. **2016**(89), 161-174. ISSN 0141-8130
10. PHAM, T. H., 2004. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology*. **150**(10), 3405-3413. DOI: 10.1099/mic.0.27357-0. ISSN 1350-0872.
11. VERLINDEN, R.A.J., D.J. HILL, M.A. KENWARD, C.D. WILLIAMS a I. RADECKA, 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. **102**(6), 1437-1449. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
12. MUHR, Alexander, Eva Maria RECHBERGER, Anna SALERNO, et al. *Biodegradable latexes from animal-derived waste: Biosynthesis and characterization of mcl-PHA accumulated* by *Ps. citronellolis*. DOI:10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.009. ISBN 10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.009

13. BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK, 2016. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*. **6**(1), -. DOI: 10.1038/srep26612. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/srep26612>
14. BOOTHROYD, Peter. a Xuân Nam. PHAM. Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi. DOI: doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.018.
15. The effect of temperature on the biodegradation test, 2004. *Materials Science and Engineering: C*. **5**(24), 659-662.
16. Detection, synthesis, structure, and function of oligo(3-hydroxyalkanoates): contributions by synthetic organic chemists, 1999. *Int J Biol Macromol*. **25**(1-3), 217-36.
17. SEEBACH, Dieter a Monica G. FRITZ, 1999. Detection, synthesis, structure, and function of oligo(3-hydroxyalkanoates): contributions by synthetic organic chemists. *International Journal of Biological Macromolecules*. **25**(1-3), 217-236. DOI: 10.1016/S0141-8130(99)00037-9. ISSN 01418130. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813099000379>
18. TIAN, J., A. J. SINSKEY a J. STUBBE, 2005. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology* [online]. **187**(11), 3814-3824 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.187.11.3814-3824.2005>
19. YABUUCHI, Eiko, Yoshimasa KOSAKO, Ikuya YANO, Hisako HOTTA a Yukiko NISHIUCHI, 1995. Transfer of Two Burkholderia and An Alcaligenes Species to Ralstonia Gen. Nov. *Microbiology and Immunology*. **39**(11), 897-904. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x. ISSN 03855600. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x>
20. POHLMANN, Anne, Wolfgang Florian FRICKE, Frank REINECKE, et al., 2006. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*. **24**(10), 1257-1262. DOI: 10.1038/nbt1244. ISSN 1087-0156. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt1244>
21. BOWIEN, Botho a Bernhard KUSIAN, 2002. Genetics and control of CO<sub>2</sub> assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Archives of Microbiology*. **178**(2), 85-93. DOI: 10.1007/s00203-002-0441-3. ISSN 0302-8933. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-002-0441-3>
22. SPIEKERMANN, Patricia, Bernd H. A. REHM, Rainer KALSCHEUER, Dirk BAUMEISTER a A. STEINBÜCHEL, 1999. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids



- and other lipid storage compounds: the origin, evolution, and impact of doi moi. *Archives of Microbiology*. **171**(2), 73-80. DOI: 10.1007/s002030050681. ISSN 0302-8933. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002030050681>
23. IGNEA, Codruta, Ivana CVETKOVIC, Sofia LOUPASSAKI, Panagiotis KEFALAS, Christopher B JOHNSON, Sotirios C KAMPRANIS a Antonios M MAKRIS, 2011. Improving yeast strains using recyclable integration cassettes, for the production of plant terpenoids. *Microbial Cell Factories*. **10**(1), 4-. DOI: 10.1186/1475-2859-10-4. ISSN 1475-2859.
  24. ALI, Iftikhar a Nazia JAMIL, 2016. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Frontiers in Biology*. **11**(1), 19-27. DOI: 10.1007/s11515-016-1389-z. ISSN 1674-7984. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11515-016-1389-z>
  25. LIM, Janice, Mingliang YOU, Jian LI a Zibiao LI, 2017. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. **79**, 917-929. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.132. ISSN 09284931. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117315357>
  26. BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ, 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*. **8**(11), 791-808. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2014.82. ISSN 1788618x.
  27. Priemerné mesačné ceny plastov, 2015. Plasticportal [online]. Nitra: ICOSA [cit. 2018-04-28]. Dostupné z: <http://www.plasticportal.sk/sk/ceny-polymerov/lm/1/>
  28. GE, Liya, Giin-Yu AMY TAN, Lin WANG, Chia-Lung CHEN, Ling LI, Swee NGIN TAN a Jing-Yuan WANG. Determination of monomeric composition in polyhydroxyalkanoates by liquid chromatography coupled with on-line mass spectrometry and off-line nuclear magnetic resonance. *Talanta*. 2016, **146**, 107-113. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.08.029. ISSN 00399140
  29. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Bacillus subtilis* isolated from soil samples, 2014. *Malaya Journal of Biosciences*. **1**(1), 8-12.
  30. KLOUDA, Pavel, 2003. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-863-6907-2.
  31. DEAN, John A., c1995. Analytical chemistry handbook. New York: McGraw-Hill. ISBN 00-701-6197-6.
  32. FISCHER, Oldřich, 1984. *Fyzikální chemie: (termodynamika, elektrochemie, kinetika, koloidní soustavy : učebnice pro vysoké školy)*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. ISBN (Váz.).
  33. Laboratory instrumentation, 1995. 4. ed. New York: Wiley. ISBN 04-712-8572-2.

34. A new way of quantifying the production of poly(hydroxyalkanoate)s using FTIR, 2016. *Chemical Technology and Biotechnology*. 5(91), 1240-1249.
35. BAKEEV, Katherine A., 2010. *Process analytical technology: spectroscopic tools and implemented strategies for the chemical and pharmaceutical industries*. 2nd ed. Chichester, West Sussex: Wiley. ISBN 978-0-470-72207-7.
36. SAMEK, Ota, Stanislav OBRUČA, Martin ŠILER, et al., 2016. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensor*. **16**(1808), 1-7. DOI: 10.3390/s16111808. ISBN 10.3390/s16111808. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/16/11/1808>
37. SKOOG, Douglas A., F. James. HOLLER a Stanley R. CROUCH, c2007. *Principles of instrumental analysis*. 6th ed. /. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. ISBN 978-049-5012-016.
38. NAVRÁTIL, Leoš, 2005. *Medicínská biofyzika*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1152-2.
39. SLANINOVA, Eva, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, et al., 2018. Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **102**(4), 1923-1931. DOI: 10.1007/s00253-018-8760-8. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-8760-8>
40. KOLLER, Martin a Alejandra RODRÍGUEZ-CONTRERAS, 2015. Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA. *Engineering in Life Sciences*. **15**(6), 558-581. DOI: 10.1002/elsc.201400228. ISSN 16180240. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201400228>

**7.1 Zoznam skratiek**

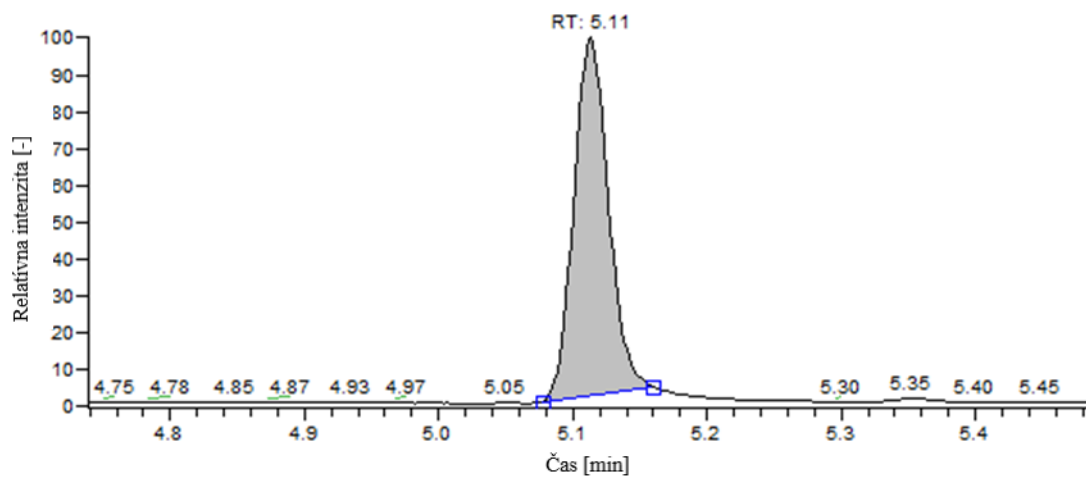
<b>Skratka</b>	<b>Význam</b>
PHA	polyhydroxyalkanoát
DSC	diferenčná skenovacia kalorimetria (differential scanning calorimetry)
Scl	krátka dĺžka reťazca (short-chain-length)
Mdl	stredne dlhá dĺžka reťazca (medium-chain-length)
PP	polypropylén
CoA	koenzým A
PHB	polyhydroxybutyrát
3HB	3-hydroxybutyrát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
P(3HB)	poly(3-hydroxybutyrát)
NB	Nutrient Broth
FTIR	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (Fourier transformed infrared)
R <sup>2</sup>	koeficient spoľahlivosti
CFU	nepriame stanovenie buniek (colony-forming-unit)
UV	ultrafilové (ultraviolet)
UV-VIS	ultrafialová a viditeľná oblasť spektra (ultraviolet-visible)
ATR	zoslabený úplný obraz (attenuated total reflectance)
TGA	termogravimetrická analýza (thermogravimetric analysis)
HPLC	vysokotlaková kvapalinová chromatografia (high-pressure-liquid-chromatography)
GC	plynová chromatografia (gas-chromatography)
FID	plameňový detektor (flame ionization detector)
MESCO	roztok stopových prvkov
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kyselina sírová

**7.2 Zoznam symbolov**

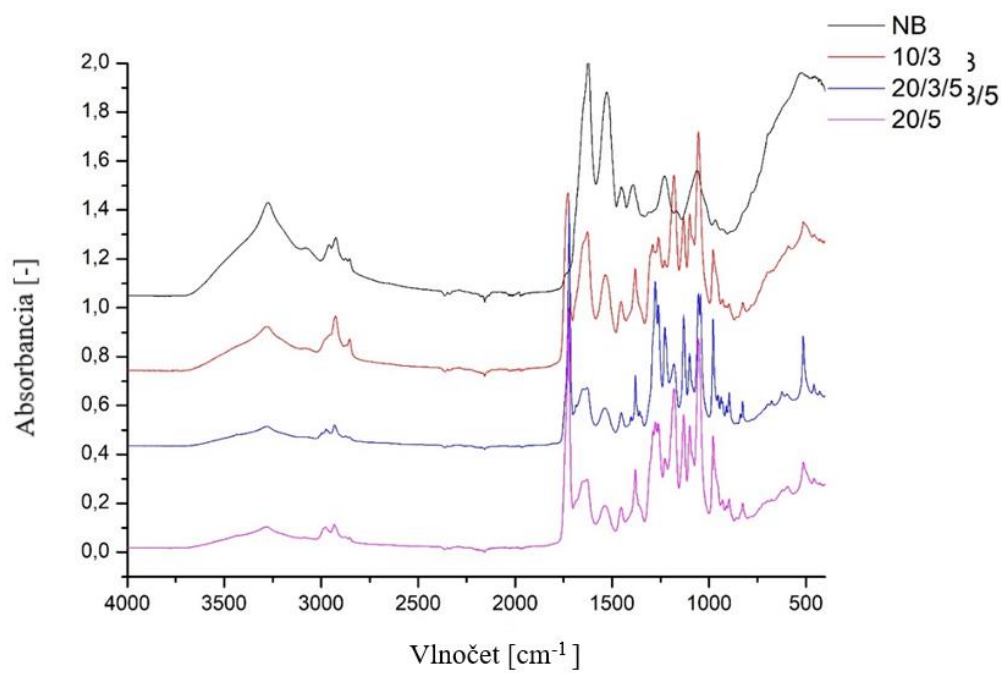
<b>Symbol</b>	<b>Význam</b>
°C	stupeň Celzia
K	Kelvin
A	absorbancia
ε	molárny absorpčný koeficient
M	molárna koncentrácia
l	hrúbka steny kyvety
MO	počet buniek

$z$	zriedenie
$X$	podiel objemu vzťahnutý na 1 ml
cm	centimeter
$\text{cm}^{-1}$	reciproký centimeter
nm	nanometer
$\text{nm}^{-1}$	reciproký nanometer
$\mu\text{m}$	mikrometer
g	gram
mg	miligram
l	liter
ml	mililiter
min	minúta
hod	hodina
rpm	otáčok za minútu (revolutions per minute)
$\varepsilon$	absorpčný koeficient
$\lambda$	vlnová dĺžka
J	Joul
Q	teplo
$T_m$	teplota skleného prechodu (melting point)

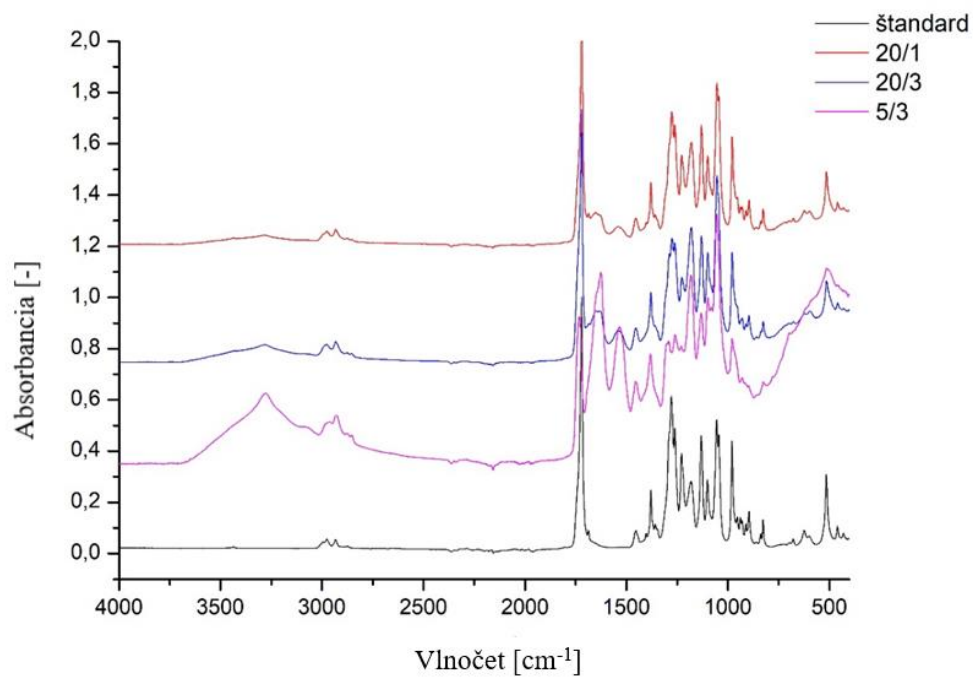
## 8 ZOZNAM PRÍLOH



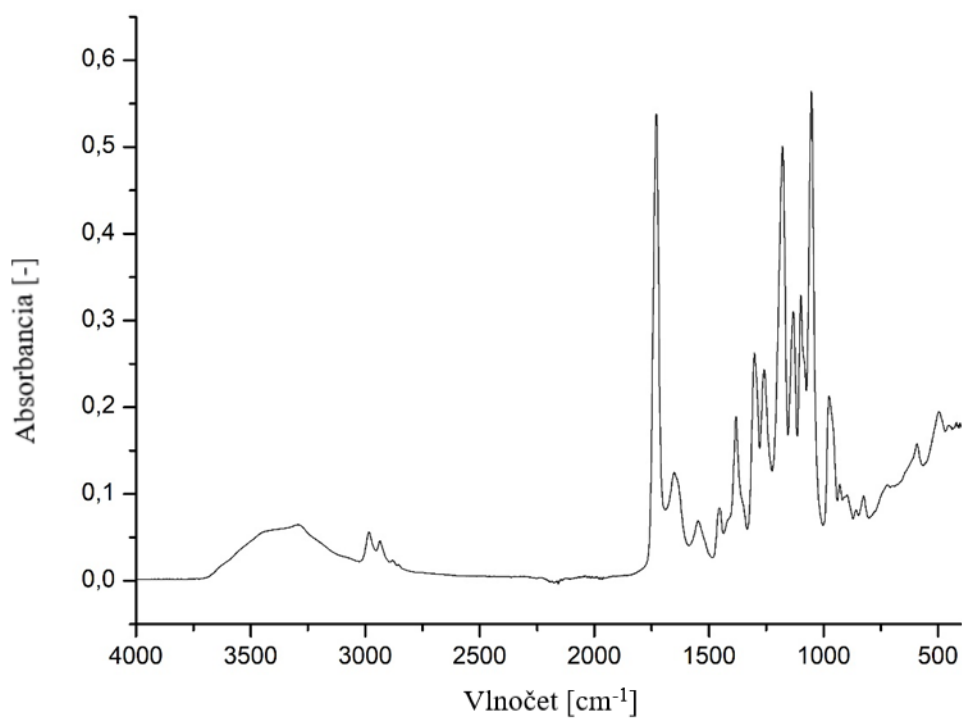
Obrázok 29 Chromatogram štandardu P(3HB)



Obrázok 30 FT-IR výsledné spektrum závislosti absorbancie na vlnôčte pre médiá NB; 10/3; 20/3/5; 20/5



Obrázok 31 FT-IR výsledné spektrum závislosti absorbancie na vlnočte pre médiá 20/1;20/3;5/3 a štandardu



Obrázok 32 Ukážkové spektrum infračervenej spektroskopie média 20/1 sušeného na ATR kryštáli

Tabuľka 6 Vybrané údaje z merania DSC (pri 1. a tretom cykle zahrievania) pre jednotlivé médiá

1. cyklus		Topenie			3. cyklus	Topenie		
médiá	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>1</sub> [°C]	Q [J/g]	T <sub>2</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>1</sub> [°C]	Q [J/g]	T <sub>2</sub> [°C]
NB	-	-	-	-	-	-	-	-
10/3	157,18				-5,61			
20/3/5	-	164,25	20,53	167,97	-5,14	159,97	15,49	168,91
20/5	-	158,95	32,88	171,43	-4,41	157,06	42,28	169,77
20/1	-	162,23	54,41	173,7	-	157,73	55,89	172,53
20/3	-	162,65	26,23	169,31	-3,35	159,23	26,16	170,27
5/3	155,38	-	-	-	-6,27	-	-	-